

Aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Professor Dr. H. Bredt)

**Karyometrische und cytophotometrische
Untersuchungen über den Kernstoff-
wechsel (DNS- PO_4^- -Gruppen)
der Milchdrüse bei hormonaler Stimulation**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
-der-
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
Uwe Klein
aus Magdeburg

Mainz 1971

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Professor Dr. H. Bredt)

**Karyometrische und cytophotometrische
Untersuchungen über den Kernstoff-
wechsel (DNS-PO_4^- -Gruppen)
der Milchdrüse bei hormonaler Stimulation**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
Uwe Klein
aus Magdeburg

Mainz 1971

Dekan : Professor Dr. Dr. W. Ketterl

Referent : Professor Dr. R. Bässler

Korreferent : Professor Dr. H. Eredt

Tag der mündlichen Prüfung : 18. Januar 1972



Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methode	8
1. Tierexperimente	8
2. Karyometrie	9
3. Cytophotometrie	13
4. Mikrofluorometrische Messungen	17
III. Ergebnisse	23
1. Quantitative Kernmessung	23
Statistische Auswertung	29
2. Cytophotometrische Untersuchungen	45
Statistische Auswertung	47
IV. Diskussion	52
1. Zur Biochemie des Kernstoffwechsels	
als methodische Voraussetzung	52
2. Ergebnisse eigener Untersuchungen	
und deren Deutung	58
V. Zusammenfassung	62
VI. Literaturverzeichnis	64

Lebenslauf

I. EINLEITUNG

Die Milchdrüse ist in ihrer Funktion wie auch in ihrem morphologischen Aufbau von hormonalen Regulationen abhängig (ASTWOOD u. Mitarb., 1937; FOLLEY, 1952, 1955; FLUX u. MUNFORD, 1957; BENSON u. Mitarb., 1957). Sie unterliegt einem tiefgreifenden Strukturwandel, der Rückschlüsse auf die funktionellen Leistungen zuläßt. Zusammenfassende Darstellungen: DABELOW (1957), KON u. COWIE (1961).

Eine besondere Fragestellung wurde von SCHAIRER (1936) aufgegriffen, der durch Messungen an Zellen der ruhenden und laktierenden menschlichen Brustdrüse unterschiedliche Kernvolumina feststellte. Im Epithel der Milchdrüse von Ziegen und Ratten konnte MOSIMANN (1957) eine Abhängigkeit der Zellkerngröße vom Funktionszustand und bei Stilboestrol-Zufuhr erkennen. Schon DOLLAY (1925) hatte an Pankreaszellen einen Zusammenhang zwischen funktionell aktiven Zellen und ihren Kerngrößen in der Kern-Plasma-Relation gesehen. CASPERSSON und HOLMGREN (1934) stellten Änderungen der Kerngröße in verschiedenen Phasen der Leberfunktion von Mäusen fest. Inzwischen sind weitere Beobachtungen von verschiedenen Autoren veröffentlicht worden,

die in der Aussage münden, daß eine funktionelle Belastung der Zelle eine Vergrößerung des Kernes nach sich zieht (BENNINGHOFF, 1950, 1951; PUFF, 1951; KULENKAMPFF u. WÜSTENFELD, 1954; ALFERT u. Mitarb., 1955; RATHER, 1958; BUCHER, 1959; GRUNDMANN u. BACH, 1960; MAYERSBACH u. SCHLAGER, 1960). BENNINGHOFF (1950) sah in der Volumenzunahme des Kernes bei Beanspruchung des Cytoplasmas das "funktionelle Kernödem". In diese Richtung gehen auch Untersuchungen, die GRUNDMANN (1964) einen "KERNVOLUMENTEST" nannte, wenn ein spezifischer Zelltyp mittels seiner besonderen Funktion und der Auswirkung auf den Zellkern geprüft wurde. Den unmittelbaren Zusammenhang der Kerngröße mit der synthetischen Aktivität des Kernes untersuchten OEHLERT und SCHULTZE (1960), GERBAULET u. Mitarb. (1961) durch Verwendung von markierten Aminosäuren zur autoradiographischen Erfassung des Eiweißstoffwechsels. Eine umfassende Zusammenstellung über Arbeiten von anatomischen und biochemischen Veränderungen an der Milchdrüse unter Berücksichtigung von quantitativen Erfassungsmethoden brachte MUNFORD (1964). Bei Gabe von Östrogen und Progesteron an ovariectomisierte juvenile Ratten wurde eine vollständige lobulo-alveoläre Entwicklung der Milchdrüse erreicht, wobei das Absetzen einen kurzzeitig wirksamen se-

kreterischen Impuls ausübt und die Alveolen der Mamma erweitert (CURTISS, 1949).

KIRKHAM und TURNER (1954) fanden eine Vermehrung der Nukleoproteine während der Gravidität und Laktation von ovariectomierten Ratten bei Behandlung mit Ovarialhormonen. Mit markierten Steroiden haben KING, GORDON und INMAN (1965) den direkten Einfluß von Östrogen auf die Synthesevorgänge im Uterus- und im Mamma-Carcinom veranschaulicht. BÄSSLER und FORSSMANN (1964) stellten mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen unter experimenteller Östrogenwirkung auf die Mamma einen erhöhten Ribosomengehalt fest, der eine vermehrte Proteinsynthese zur Folge hat. In der Involutionsphase der Mamma nimmt die Ribonukleinsäure (RNS) ab, was auf eine verminderte Transkription von seiten der Desoxyribonukleinsäure (DNS) hinweist (GRIFFITH u. TURNER, 1961; TUCKER u. REECE, 1963 a,b,c). Die vermehrte RNS Bildung führt durch die Translation zu einer erhöhten Eiweißsynthese und hat auch ihr morphologisches Substrat in der Vergrößerung der Zellkerne (LEUCHTENBERGER, 1950; LEUCHTENBERGER u. SCHRADER, 1950; MIRSKY u. RIS, 1951; LEUCHTENBERGER u. Mitarb., 1951; STÖCKER, 1962 a, b). Untersuchungen von POLLISTER

u. Mitarb. (1952), ALTMANN und GRUNDMANN (1955) mit dem Phasenkontrastmikroskop zeigten eine erhöhte Auflockerung der Chromosomen bei zunehmender Kerngröße. Sie sahen in der starken Verquellung der Chromosomen die Voraussetzung für eine erhöhte Syntheseaktivität. In der Behandlung von Euchromatin und Heterochromatin ging SANDRITTER (1970) bei der Stimulierung der Zellkernfunktion von einer Umwandlung des dichtgepackten kondensierten Chromatin in ein lockeres Chromatin aus. Weitere Untersuchungen ergaben, daß unter Hormoneinfluß ein potentiell genetisch aktives Chromatin durch den entsprechenden Stimulus entspiralisiert bzw. aufgelockert wird und dadurch eine genetische Aktivität zeigt. Diese Strukturveränderung geht mit einer elektronenoptisch nachgewiesenen vermehrten RNS-Synthese durch die Translation in eine Proteinsynthese über, die sich in einer Verdickung der DNP-(Desoxyriboprotein) Filamente ausdrückt (RIS, 1967).

Erste Anwendungen mit der Mikrocytophotometrie machte CASPERSSON (1936, 1950) zur Aufklärung der Zellkernstrukturen und ihrer Absorptionsspektren. Akridinorange (AO), in seiner Grundstruktur ein Benzochinolin und mit den Chemotherapeutica Atebrin und Rivanol aus der Akridinreihe verwandt, das erst als Fluorochrom für Pflanzenstrukturen benutzt wurde (BUKATSCH u. HAITINGER, 1940),

kann durch seine grüne Fluoreszenz dem spezifischen Nachweis für DNS (Desoxyribonukleinsäure) dienen und durch die metachromatische Rotfluoreszenz dem von RNS (STRUGGER, 1949; SCHÜMMELFEDER, 1948, 1950; SCHÜMMELFEDER u. Mitarb., 1957; BERTALANFFY u. BICKIS, 1956; BERTALANFFY, 1963). Der verschiedene Grad der Anfärbbarkeit der DNS mit kationischem AO (Akridinorange), der durch die unterschiedliche Zahl der anionischen PO_4^- -Gruppen (Phosphat-Gruppen) gegeben ist, wurde durch Spectralanalysen und verschiedene Differenzierungen in Farbstoffkonzentration, Wellenlänge und pH-Wert nachgewiesen (STRUGGER, 1940; BRADLEY, 1961; STONE u. BRADLEY, 1961; ZANKER, 1952 a,b; ZANKER u. Mitarb., 1959). Die monomere Molekularform der AO (Akridinorange) bei der Bindung an die helikale Struktur der DNS, wie sie das Modell von WATSON, CRICK u.a. (CRICK, 1961; WATSON, 1958) erklärt, macht eine Aussage über den Verknäuelungsgrad der Helix möglich (BORISOVA u. TUMERMANN, 1965). JACOB und MONOD (1961) gaben durch das Operatormodell eine Erklärung für die Regulation des jeweiligen Funktionszustandes bei der Proteinsynthese. Repressionsmoleküle blockieren genetische Information und dadurch die m-RNS-Synthese (Boten-Ribonukleinsäure) und geben zu einer Veränderung in der helikalen Struktur Anlaß

(FRENSTER u. Mitarb., 1963; RIS, 1967; HERRMANN u. Mitarb., 1969). Die Entfernung von Histonen am DNS-Histon-Komplex brachte einen verstärkten Nachweis von RNS und Kernproteinen (ALLFREY u. MIRSKY, 1962; HUANG u. BONNER, 1962; ALLFREY u. Mitarb., 1963; BONNER u. HUANG, 1964; BILLEN u. HNILICA, 1964; BONNER, 1965). Die erhöhte kationische AO-Farbstoffbindung im Chromatin über DNS-PO_4^- -Gruppen (Desoxyribonukleinsäure-Phosphat-Gruppen) zeigt eine Freisetzung von PO_4^- -Gruppen bei Abnahme von Histonen, wobei jedoch keine Vermehrung des DNS-Gehaltes nachgewiesen wurde (KILLANDER u. RIGLER Jr, 1965; COOPER u. RUBIN, 1965; BLACK u. ANSLEY, 1965). Die Fluoreszenzemission der eingelagerten AO-Moleküle kann quantitativ bestimmt werden (RIGLER, 1966). Gerontologische Arbeiten wiesen auf eine geringe Abnahme der Zellkerngröße zwischen "jungen" und "alten" Leberzellkernen, die mit einer Abnahme der "freien" DNS-PO_4^- -Gruppen einherging, wobei der Gesamtgehalt der DNS keine altersabhängige Veränderung zeigte (TAUCHI u. SATO, 1962; DENKHAUS u. HEIMER, 1970).

Aufgrund all dieser Untersuchungen schien es gerechtfertigt, die karyometrischen Veränderungen der Zellkerngröße

von Rattenmilchdrüsen in Zusammenhang mit mikrocytophotometrischen Messungen der AO-Bindungskapazität an "freie" DNS- PO_4^- -Gruppen zu untersuchen und funktionell bedingte Veränderungen des Kernstoffwechsels unter Hormoneinwirkung aufzuzeigen.

II. MATERIAL und METHODE

1. Tierexperimente

Der Untersuchung dienten Albinoratten eines reinen Sprague-Dawley-Stammes, die in Drahtkäfigen bei Zimmertemperatur gehalten wurden. Zur Nahrung erhielten die Tiere Altromin-Preßlinge und Trinkwasser. Juvenilen, weiblichen Ratten (Gewicht um 110 g) wurden unter Äthernarkose durch einen dorsalen, etwa 1 cm großen, beidseitigen Einschnitt die Eileiter mit zuführenden Gefäßen unterbunden und die Eierstöcke exzidiert. Nach primärer Wundheilung begann die Hormonbehandlung 5 Tage nach der Ovariectomie durch tägliche intramuskuläre Injektionen der Homonlösung wechselseitig in die Oberschenkel der beiden Hinterläufe.

Zum Vergleich mit hormonbehandelten Tieren wurden weibliche Jungratten (Gewicht um 120 g), hochgravide Tiere (Gewicht zwischen 200 und 280 g) und Muttertiere (Gewicht 230 bis 280 g) mit 5 bis 10 Jungen genommen.

Die ovariectomierten Tiere wurden in zwei Versuchsgruppen eingeteilt,

eine mit Ö s t r o g e n :

Tagesdosis von 5 γ (Gamma) Progynon,
einem Östradiol-Benzoeat (Schering AG, Berlin)

in einer Verdünnung mit indifferentem

Cetiolöl 1 : 50;

eine mit Ö s t r o g e n - P r o g e s t e r o n :

Tagesdosis eines Gemisches von 5 γ (Gamma)

Progynon, mit indifferentem Cetiolöl 1 : 50

verdünnt, und 1 mg Proluton, einem Hydroxy-

Progesteron-Kapronat (Schering AG, Berlin).

Nach MEITES (1959) sind dies optimale Dosierungen, um bei der Ratte ein Wachstum des Drüsenbaumes zu induzieren. Zwei Tage nach Beendigung der Injektionen wurden die Tiere getötet, oder es wurde bei der Verwendung zu Involutionsversuchen der zweite Tag nach Ende der Behandlung als erster Tag der Rückbildung festgesetzt, da solange mit einer Nachwirkung der Hormone zu rechnen ist. Unter Äthernarkose wurden die abdominellen Milchdrüsen entnommen.

2. Histologie und Methode zur Kernmessung

Die entnommenen Gewebestücke wurden in CARNOY'scher Flüssigkeit fixiert und in Paraffin eingebettet (ROMEIS, 1948). Von diesen Gewebeblöcken wurden 8 μ dicke Schnitte angefertigt, die mit einer Kernfärbung nach P. MAYER

(mit saurem Hämalaun) und einer Plasmafärbung mit Eosin versehen wurden (ROMEIS, 1968).

Mit einem VISOPAN-Gerät (Firma Reichert, Wien) mit Halogenlampe wurden die eingedeckten Präparate bei einer 1250-fachen Vergrößerung (Objektiv: Zeiss, Plan 100/1,25 Oel; Okular: 12,5-fache Vergrößerung) mit einer Meßlupe gemessen.

Zur Messung der Kerngröße wurden die Durchmesser des optisch größten Kernquerschnittes und des darauf senkrecht stehenden benutzt, die sich aus den meist ellipsenförmigen Kernschnittflächen ergaben (JACOBJ, 1925, 1931; SCHAI-RER, 1936; MOSIMANN, 1957; OEHLERT u. SCHULTZE, 1960). Um parallaktische Meßfehler zu vermeiden, wurden die zu messenden Alveolenkerne in die Mitte des Gesichtsfeldes eingestellt. Ebenso hat sich eine Schnittdicke von 8 μ als optimal erwiesen, um Fehlerquellen bei Kernkalottenmessungen zu vermeiden (JACOBJ, 1925). Hilfreich sind auch die Untersuchungen von MOSIMANN (1957), die eine veränderte Stellung der Ellipsenhauptachse, je nach dem Funktionszustand der Kerne, erkennen läßt. Bei der unentwickelten Milchdrüse (juvenil oder adult) erscheinen die Kerne als radiär gestellte Ellipsen in der Schnittfläche. Im Stadium der Sekretretention in den Alveolen steht der Längsdurchmesser tangential zur Alveolenwand. Die Epithel-

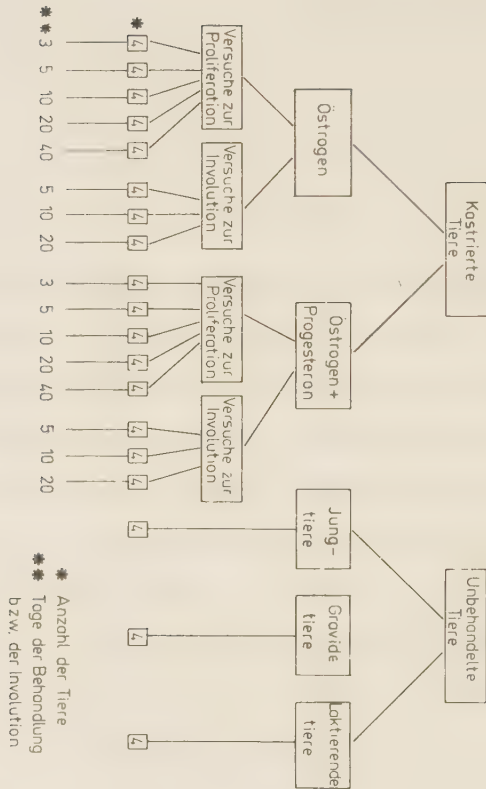


Abb.: 1

Schema des Versuchs im karyometrischen Teil.

höhen wurden an zwei gegenüberliegenden Stellen gemessen.

Es wurden insgesamt 84 Ratten in dieser Versuchsreihe gemessen. Bei dem Umfang der durchzuführenden Messungen und Berechnungen wurde jedes Tier mit einem Schnittpreparat histometrisch ausgewertet. In jedem Präparat wurden an drei peripheren und an drei zentralen Alveolen jeweils fünf Kerne mit zwei aufeinander senkrecht stehenden Durchmessern bestimmt. Für jedes Präparat kamen damit 30 Kerne zur Auswertung.

In jeder Alveole wurden noch zwei Epithelhöhen für vergleichende Betrachtungen ermittelt.

In der Einteilung der Zeitstadien wurden jeweils vier Tiere gleich behandelt, so daß sich dadurch die Gesamtzahl der auszuwertenden Kerne auf 120 erhöhte.

Es wurden Zeitstadien mit 3, 5, 10, 20 und 40 Tagen täglicher Hormoneinspritzung gebildet. Bei Tieren, die nach 20 Tagen Injektionsbehandlung in eine Rückbildungsphase eingetreten waren, war nach 5, 10 und 20 Tagen Involution Gewebe entnommen worden. Diese Tiere werden im folgenden nur noch mit dem Terminus "5 Tage Involution, 10 Tage Involution" usw. angesprochen. Insgesamt ergeben sich daraus 8 verschiedene Zeitbetrachtungen.

Übergeordnet ist dieser Einteilung die Trennung in die zwei Versuchsgruppen, die sich aus der Anwendung von

Ö s t r o g e n bzw. kombiniertem Ö s t r o g e n -
P r o g e s t e r o n ergaben. Diese beiden hormonellen
Versuchsgruppen wurden mit den Ergebnissen des physiolo-
gischen Ablaufs verglichen, wobei eine Einteilung in Jung-
tiere, gravide Tiere und laktierende Tiere einer Zeiteinteil-
lung in 3 Stadien entsprechen würde. Pro Tier wurde eben-
falls ein Präparat angefertigt, an dem die gleichen Messun-
gen, wie oben angegeben, vorgenommen wurden.

Zur Kontrolle wurden für die Dauer des Versuchs ovari-
tomisierte Ratten gehalten, deren histologische Präparate
als Nullzeitpunkte ausgewertet wurden (Abb. 1).

3. Histologie und Methode zur Bestimmung der "freien" PO_4^{--} -Gruppen der DNS

Es kamen insgesamt 65 Ratten zur Auswertung. Von jedem
Tier wurden zwei Ausstrichpräparate angefertigt. Auf je-
dem Präparat wurden bei der mikrophotometrischen Messung
20 Kerne ausgewertet. Jeweils 5 Tiere erhielten Hormon-
injektionen in unterschiedlichen Zeitstadien von 3, 6, 12 Tagen
bzw. 12 Tagen mit nachfolgenden 5 Tagen Involution. (Zur
Ovariectomie und Vorbehandlung siehe Ausführungen über
Kernmessung).

Es wurden auch hier zwei Versuchsgruppen durchgeführt
(Anwendung von Ö s t r o g e n bzw. von kombiniertem

Ö s t r o g e n - P r o g e s t e r o n).

Zum Physiologischen Vergleich wurden je 5 Tiere im Jungtier-, Graviden- und Laktations-Stadium herangezogen.

Als Kontrolle und zugleich Nullwert dienten 5 ovariectomier- te juvenile Ratten.

Um keine sekundären Veränderungen durch Alterung entstehen zu lassen, wurde die tägliche Hormoninjektion der einzelnen Zeitstadien so begonnen, daß an zwei aufeinander folgenden Tagen die Tötung der Albino-Ratten und die Anfertigung der benötigten Ausstrichpräparate unternommen werden konnte. Unter dem Mikroskop freipräparierte Gewebestücke des Drüsenzentrums wurden als natives Ausstrichpräparat auf einen mit HCl-Alkohol gereinigten Objektträger mit zu vernachlässigender Eigenfluoreszenz (Fa. O. Kindler, Freiburg) durch 15 Minuten lange Lufttrocknung bei Raumtemperatur von 20° Celsius fixiert. Es erfolgte keine weitere histochemische Fixierung. Bis zur gemeinsamen Färbung und Auswertung wurden die Ausstrichpräparate im Kühlschrank bei -25° Celsius aufbewahrt (maximale Aufbewahrungsdauer: 10 Tage).

Die Färbungen wurden nach den standardisierten Angaben von RIGLER (1966) in einem erschütterungsfreien Wasserbad bei 20° C durchgeführt, um die Aktivität von nukleinsäurespaltenden Enzymen zu vermindern. Die Glasküvetten

wurden immer mit 100 ml einer jeweiligen Reaktionslösung gefüllt, da sich die Diffusionsgeschwindigkeit des Farbstoffes mit der Konzentration ändert. Alle Objektträger wurden von einer zur anderen Küvette gleichzeitig gewechselt und der gegenseitige Abstand der zufallsmäßig gemischtstehenden Präparate auf 5 mm gehalten. Jeder Färbegang enthielt zwei Präparate je Tier, wobei jeweils ein Tier aus jedem Zeitstadium vertreten war, um bei evtl. auftretenden Einflüssen durch den Färbegang doch vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Nach jedem Färbegang wurden sämtliche Lösungen verworfen und aus einer Stammlösung ersetzt, die in ausreichender Menge für die gesamten Untersuchungen angesetzt war. Das Gemisch aus Pyridin und Essigsäureanhydrid wurde jeweils frisch angesetzt. Nach Reinigen von Assoziaten in einer Al_2O_3 -Säule (ZANKER, 1952 a) und Überprüfung des Reinheitsgrades nach RIGLER (1966) wurde das Akridinorange (Fa. E. Merck, Darmstadt; C.J.46005; S. Nr. 902) in einer Standardlösung von 1 mg/ml aqua bi-dest bei + 4° Celsius aufbewahrt. Daraus wurde jeweils eine frische Farbstofflösung mit einer Endkonzentration von 10^{-4} Mol in einem Citronensäure-Phosphat-Puffer nach Mc Ilvaine vom pH 4,1 unter radiometrischer Kontrolle hergestellt (ROMEIS, 1968).

Vier Stufen werden bei der Färbung durchlaufen:

1. Blockierung der Aminogruppen durch Pyridin und Essigsäureanhydrid, um eine Beeinflussung der "freien" DNS-PO_4^- -Gruppen zu vermeiden.
2. Beseitigung des überschüssigen Essigsäureanhydrid und Pyridins durch Überführung in ein wässriges Medium.
3. Färbung mit 10^{-4} molarem AO (Akridinorange) in Citronensäure-Phosphat-Puffer nach Mc Ilvaine. Die Überführung in ein quartäres Akridiniumsalz durch Addition von Alkylhalogeniden erhöht die Löslichkeit (BEYER, 1963).
4. Abgabe von ungebundenem AO.
Die Puffermischung inaktiviert DNasen durch eine Ausfällung der notwendigen bivalenten Ionen
(Weitere detaillierte Angaben zur Färbetechnik siehe RIGLER (1966)).

4. Mikrofluorometrische Messungen:

Die Messungen wurden mit einem Mikroskop-Photometer mit variabler Meßblende im Aufbau nach BÖHM und SPRENGER (1968) vorgenommen (Fa. E. Leitz, Wetzlar).
Objekteinstellung mittels Durchlicht im Phasenkontrast
(Kondensor nach HEINE, 1931; Ölimmersionsobjektiv Pv Fl

70 x, N.A. 1,15; Niedervoltlampe 5 Volt).

Das Ausbleichen der Präparate wurde durch das Einschalten eines Interferenzdoppelbandfilters 618⁺₁₉ mm (Fa. Schott u. Gen., Mainz) niedrig gehalten.

Auflichtfluoreszenz zur Messung mit optischer Einrichtung Floem-Opak; Objektiv Pv Fl 70 x, wie oben. Anregung durch Xenon-Höchstdruckbrenner x BO 150 W (Osram, Berlin); Gleichrichter-Vorschaltgerät Typ VX 150 f - 2 b - L unter Vorschaltung eines Spannungskonstanthalters Typ EMK VX (Dominit) (beide Geräte: Fa. Siemens, Erlangen); Wärmeschutzfilter; Filterkombination von Erregerfilter: UG 1,1 mm; Sperrfilter: Interferenzbandverlaufsfilter Veril A, Typ B - 60 (alle Filter: Schott u. Gen., Mainz).

Messung bei 530 nm

M e ß e i n r i c h t u n g : S - 20 Photokathode Typ 9558 A (Fa. Emi, England); Spannungsteiler Typ SKV/K BN 345 A; hochstabilisiertes Netzgerät Typ NSHM BN 600 S/N 481, zusammengefaßt in der Lichtmeßeinrichtung Typ MFLK BN 5007 (Fa. Knott Elektronik, München).

Einstellung der Saugspannung auf 1,5 KV.

Meßinstrument: Mikroamperemeter mit Meßbereich

0,0018 - 20 μ A/Skalenteil (Fa. Norma, Wien, Austria).

Gewählte Empfindlichkeit 0,02 μ A/Skt.

Einstellung des Interferenzbandverlaufsfilters auf eine

Wellenlänge von λ 530 nm zur Emissionsmessung.

Meßvorgang:

Suchen und Einstellen eines einzeln gelegenen Zellkernes bei Wellenlänge λ 618 nm im Phasenkontrast. Ausblenden des Durchlichtes; Öffnen des Photomultipliierverschlusses und Einblenden des UV-Lichtes zur Auflichtfluoreszenz bis zum maximalen Ausschlag des Mikroamperemeters in einem Vorgang. Ausblenden des UV-Lichtes (maximale Dauer des Meßvorganges 1 Sekunde). Messung der Emission des Leerwertes in gleicher Weise neben dem Objekt.

Aus dem Färbebad wurden vor und nach der Färbung Proben entnommen und ihre Fluoreszenzemission in einer fluoreszenzfreien BÜRKER-Zählkammer gemessen. Mittels einer quadratischen Meßfeldblende wurden jeweils 20 Felder der Kammer mit einer Kantenlänge von $0,25 \times 0,25$ mm und einer Höhe von $0,1$ mm gemessen.

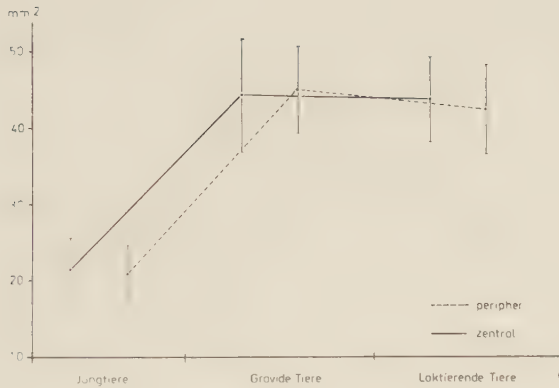


Abb.: 3 Kerngrößenrelation bei physiologischen Funktionsphasen.

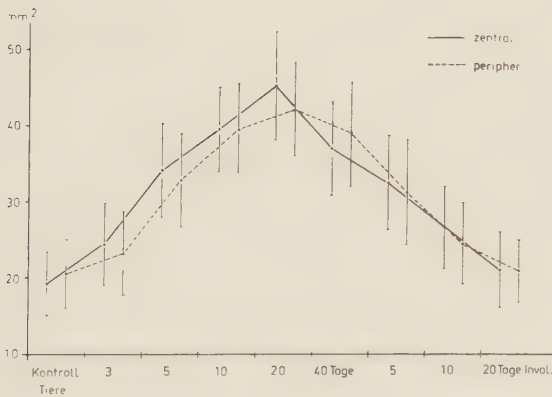


Abb.: 4 Kerngrößenrelation bei Östrogenwirkung.

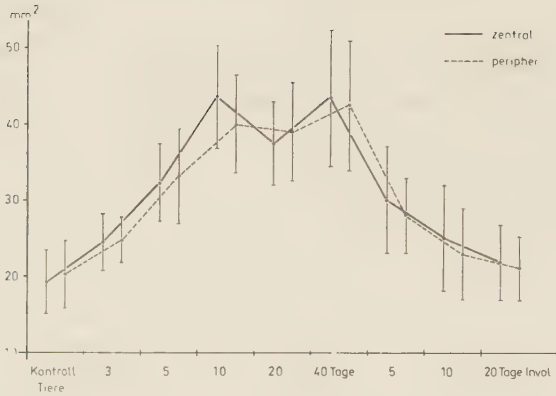


Abb.: 5 Kerngrößenrelation bei
Östrogen-Progesteron-Wirkung.

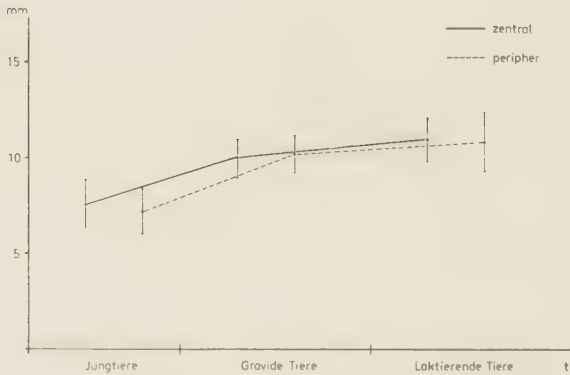


Abb.: 6 Epithelhöhenrelation bei physiologischen
Funktionsphasen.

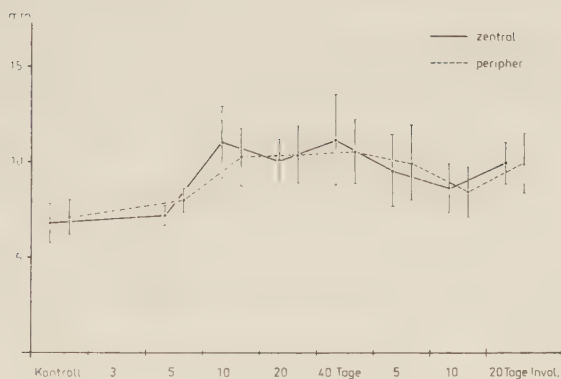


Abb.: 7 Epithelhöhenrelation bei Östrogenwirkung.

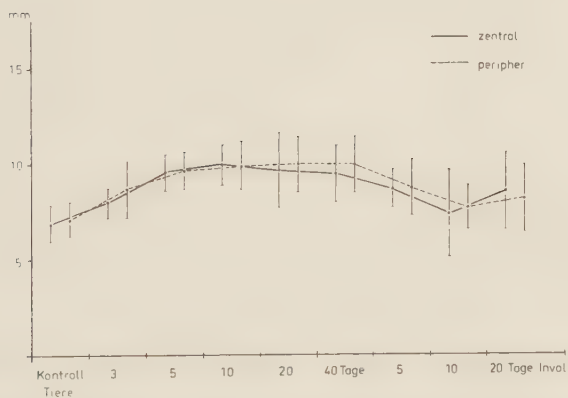


Abb.: 8 Epithelhöhenrelation bei
Östrogen-Progesteron-Wirkung.

III. ERGEBNISSE :

1. Quantitative Kernmessung:

In den graphischen Darstellungen der Abb. 3, 4 und 5 sind gemessene Kernflächen, in Abb. 6, 7 und 8 die zugehörigen Epithelhöhen in Zusammenfassung zu Mittelwerten mit entsprechenden Standardabweichungen aufgezeichnet. Dabei wurde eine Unterscheidung in zentrale und periphere Alveolen eingehalten.

Die angegebenen Größenordnungen der Ordinateneinteilungen sind keine absoluten Werte, sondern Relativwerte, die durch Ablesen der sich ergebenden Vergrößerungswerte mit der Meßlupe erhalten wurden.

Bei der Betrachtung der Kerngrößenänderungen bei physiologischem Ablauf (Abb. 3) erkennt man eine deutliche Steigerung der Kerngröße von juvenilen weiblichen Ratten zu trächtigen wie auch zu laktierenden Tieren. Dabei wird in der Gravidität ein Niveau erreicht, das während der Laktation beibehalten wird. Periphere und zentrale Anteile lassen keine Entwicklungsunterschiede erkennen.

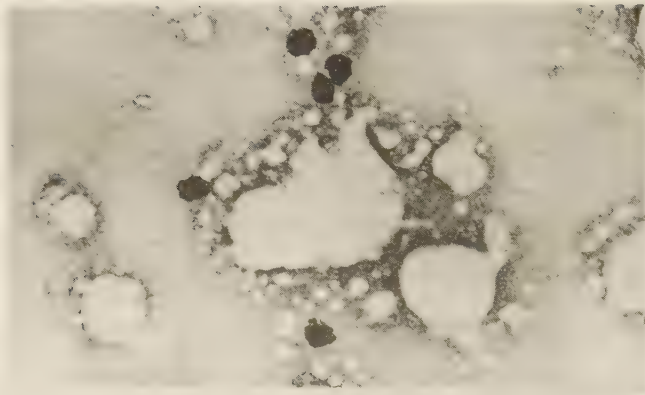
Eine Injektion von Östrogen (Abb.4) ergibt bei unbehandelten, ovariectomierten Jungtieren (Kontroll-Tieren) einen kontinuierlichen Anstieg der Kerngröße bis zum Erreichen eines Höchstwertes nach 20 Tagen.

Dabei entspricht der Anstieg dem Physiologischen im Stadium der Gravidität. Bei der Ausbildung einer Kernvergrößerung zeigen periphere Anteile ein geringgradiges Nachhinken gegenüber zentralgelegenen Kernen. Das Maximum der zentralen Anteile nach 20 Tagen wird dabei nicht erreicht. Weitere Einspritzungen über 40 Tage führten bereits zu einer Abnahme der Alveolengröße, die sich in der Involutionsphase bis zu einem Minimalwert bei 20 Tagen Involution fortsetzt.

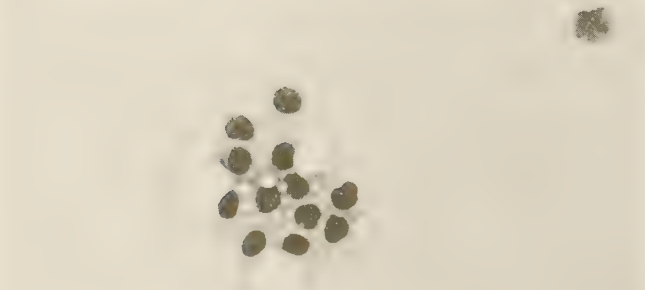
Kombinierte Östrogen-Progesteron-Injektionen zeigen ebenfalls einen steilen Anstieg nach 3,5 und 10 Tagen auf einen Maximalwert (Abb. 5). Auch 40-tägige Hormongaben lassen das erreichte Stadium der Kerngröße beibehalten. Bei den Versuchen der Rückbildung ist ein steiler Abfall nach 5 Tagen erkennbar, der sich in geringerer Abstufung bis zu 20 Tagen fortsetzt.

Bei beiden Versuchsarten fällt nach 10-tägiger Involution der Kerngrößenmittelwert auf eine geringere Größenordnung zurück, als sie nach 10 Tagen Hormoneinspritzung erreicht wird.

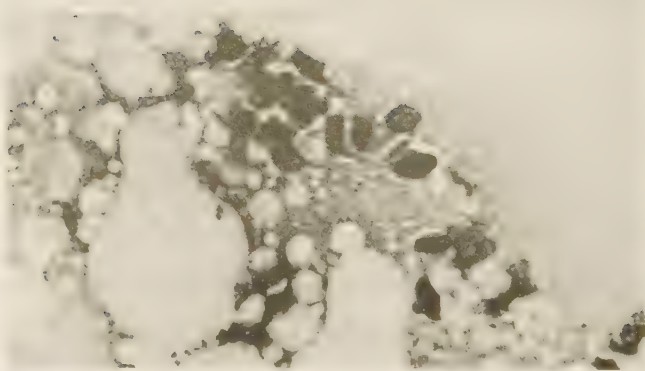
Vergleichend zur Kerngrößenmessung wurden die Epithelhöhen der zugehörigen Alveolen bestimmt. Abbildung 6 zeigt die Epithelhöhenbestimmung bei physiologischem Ablauf. Es kommt zur Steigerung der Epithelhöhen bei graviden Tieren,



3 Tage / Vergr. 585 x

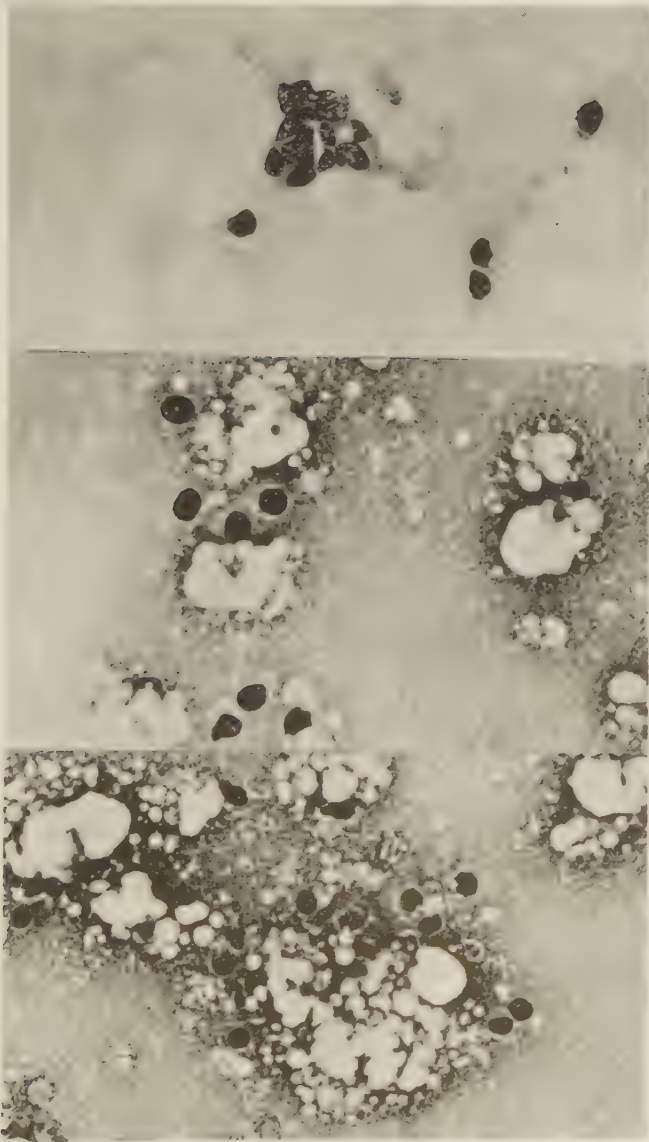


12 Tage / Vergr. 585 x



20 Tg + 5 Tg Invol.
Vergr. 720 x

Abb.: 9, 10, 11 Zellausstriche der Mamma
nach Östrogen-Behandlung.



Vergr. 585 x

Vergr. 720 x

Vergr. 124 x

Abb.: 12, 13, 14 Zellausstriche der Mamma
(juvenil, gravid, laktierend).

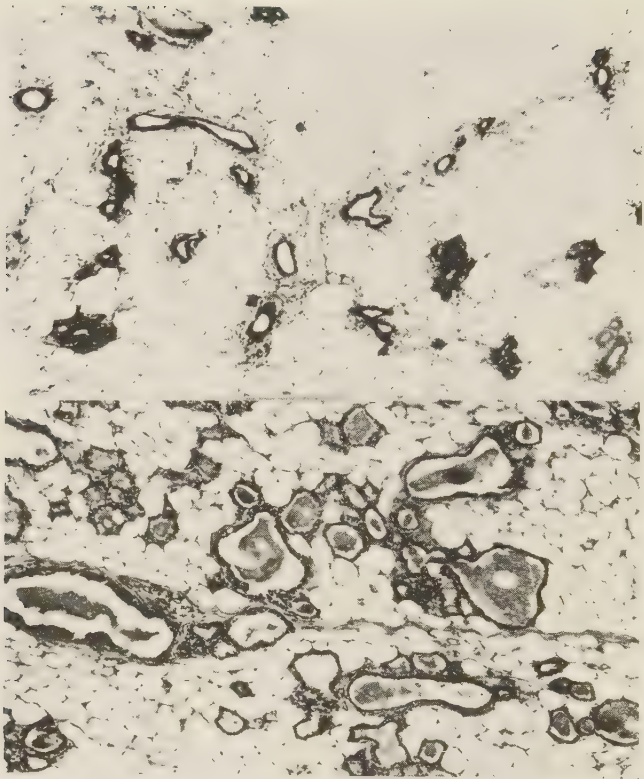


Abb.: 15, 16 Mamma nach Östrogenbehandlung
(3 Tage und 20 Tage) Vergr. 70 x

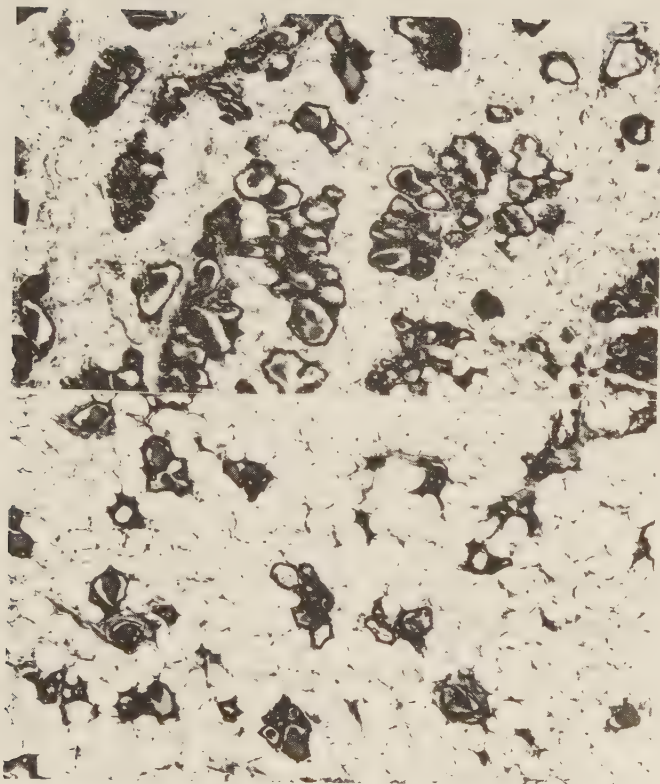


Abb.: 17, 18 Mamma nach Östrogen-Progesteron-
Behandlung
(20 Tage u. 20 Tage + 5 Tage Invol.)
Vergr. 70 x

die auch laktierende Tiere beibehalten. Sowohl die Injektion mit Östrogen wie auch die mit kombiniertem Östrogen-Progesteron führt zu einer Erhöhung des Alveolarepithels in Kontinuität zu einem Maximalniveau nach 10 Tagen. Die gesteigerte Epithelhöhe wird auch bei 20- und 40-tägiger Hormongabe beibehalten und fällt erst in der Involutionsphase auf niedrigere Werte wieder zurück. Periphere wie zentrale Epithelhöhen nehmen gleichartig an den Veränderungen teil.

Statistische Auswertung

(Quantitative Kernmessung)

Für die graphischen Darstellungen von Mittelwert und Standardabweichung wurde ein vorliegendes Programm des Computers CDC 8090 benutzt. Dabei wurde aus den aufeinander senkrecht stehenden Durchmessern a und b eines Kernes zuerst zu dessen Bestimmung die Ellipsenfläche $a \times b$ unter Auslassen des konstanten Faktors π errechnet.

Aus den Werten der jeweils 15 zentralen bzw. peripheren Kernflächen pro Präparat wurde der Mittelwert über alle 4 Tiere eines Zeitstadiums bestimmt.

Mittelwert:

$$\bar{x} = \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) / n$$

$n = 60$ (ergibt sich aus 15 Messungen pro Tier;

in jedem Zeitstadium werden 4 Tiere

zur Messung herangezogen)

Die Standardabweichung wurde nach der Formel

$$S = \sqrt{\frac{S_{xx}}{n - 1}}$$

wobei

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$= \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}$$

berechnet.

In den Kurven wurde die Standardabweichung mit dem Mittelwert zu den einzelnen Meßzeitstadien dargestellt.

Die Bestimmung der Kerngrößen und der Epithelhöhen in Abhängigkeit der Hormonversuche in verschiedenen Zeitstadien zeigen in Abb. 3 - 8 jeweils unterschiedliche Mittelwerte. Um Unterschiede von zufälligen Abweichungen zu trennen, wurde mit den Ergebnissen dieser Meßreihen eine 4-fache Varianzanalyse durchgeführt. Nach der Art der Fak-

toren und deren Anordnung handelt es sich um ein gemischtes, partiell hierarchisches Modell.

Es wurde ein Programm der STATSYS-Bibliothek des Institutes für Medizinische Statistik und Dokumentation verwendet. Die Berechnungen wurden auf dem Computer CDC 3300 des Rechenzentrums der Universität Mainz durchgeführt.

Durch die Varianzanalyse wurde der Einfluß von vier Faktoren geprüft:

- | | |
|--------------------|--|
| 1. Versuchsgruppen | (Östrogen gegen Östrogen-
Progesteron bzw.
physiol. Ablauf: Jungtier -
Gravide - Laktierend) |
| 2. Zeitstadien | (Kontrolle, Proliferation,
Involution; insgesamt 9) |
| 3. Tiere | (Die zu jedem Zeitstadium
untersuchten vier Ratten) |
| 4. Lage | (Peripher gegen zentral ge-
messene Alveolen) |

Der exakte F-Test zur Signifikanzprüfung wurde nach den Regeln von LE ROY (1965) errechnet.

Ergebnisse der Varianzanalyse:

1. Die Varianzanalyse ergibt signifikante Differenzen ($P < 0,01$) zwischen den Meßwerten der einzelnen Versuchszeitstadien bei Bestimmung der Epithelhöhen wie auch der Kerngrößen (Tab. 1 und 3).
2. Es konnte kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen mit Östrogen und denen mit kombiniertem Östrogen-Progesteron festgestellt werden.
3. Im physiologischen Ablauf sind die Ergebnisse in den drei Gruppen (Jungtiere, gravide Tiere, laktierende Tiere) statistisch signifikant ($P < 0,01$) unterschiedlich (Tab. 2 und 4).
4. Zwischen peripherer und zentraler Lage der Alveolen ergab sich kein statistisch auffälliger Unterschied.

Die in den graphischen Darstellungen sich abzeichnenden und bereits beschriebenen unterschiedlich zahlenmäßigen Ergebnisse in den verschiedenen Zeitstadien (Abb. 4,5 und 7,8) und im physiologischen Ablauf der drei Tiergruppen (Abb. 3 und 6) sind somit statistisch gesichert.

	Einfluß- größen	FG	SAQ	MAQ	F-Test	F-Wert	Signifikanz
1	Gruppen	1	81107,26	81107,26	:MAQ3(1,2)	0,028	n.s.
2	Zeitstadien	4	1416683829,28	177085478,66	:MAQ3(1,2)	62,955	P << 1 %
3(1,2)	Tiere	30	84325522,86	2812850,76	:MAQ Rest	8,716	P < 1 %
4	Lage	1	2260618,00	2260618,00	:MAQ34(1,2)	3,986	n.s.
12		8	39995200,62	4999400,07	:MAQ3(1,2)	1,777	n.s.
14		1	9110,22	9110,22	:MAQ34(1,2)	0,016	n.s.
24		8	5754775,12	719346,89	:MAQ34(1,2)	1,268	n.s.
34(1,2)		3	1701052,11	567017,37	:MAQ Rest	1,757	n.s.
124		8	8072033,21	1009004,15	:MAQ34(1,2)	1,779	n.s.
Res:		2091	674758722,17	322696,66			
Total		2159	223370197,89				

Tab.: 1 Varianzanalyse - Kernflächen - Östrogen und Östrogen+ Progesteron

	Einfluß- größen	FG	SAQ	MAQ	F-Test	F-Wert	Signifikanz
1	Gruppen	2	428221670,12	214110835,06	: 3 (1,2)	1586,821	$P \ll 1 \%$
2	Tiere	3	3019963,53	1006654,51	: 3 (1,2)	7,460	$P < 5 \%$
3 (1,2)	Lage	6	809583,94	134930,65	: Rest	0,451	n.s.
4	Messungen	14	5880826,38	420059,02	: 34(1,2)	1,642	n.s.
12		6	6701177,07	1116862,84	: 3 (1,2)	8,27	$P < 5 \%$
14		28	13122809,04	468671,75	: 34(1,2)	1,832	n.s.
24		42	11699854,16	278567,95	: 34(1,2)	0,698	n.s.
34 (1,2)		14	3579930,55	255709,32	: Rest	0,855	n.s.
124		84	17545802,07	208878,59	: 34(1,2)	0,816	n.s.
Rest		160	47817691,00	298860,56			
Total		359	538399307,91				

Tab.: 2 Varianzanalyse - Kernflächen - Physiologischer Ablauf

	Einfluß- größen	FG	SAQ	MAQ	F-Test	F-Wert	Signifikanz
1	Gruppen	1	645,33	645,33	: 3 (1,2)	0,421	n.s.
2	Zeitstadien	8	108133,83	13516,72	: 3 (1,2)	8,836	P<< 1 %
3(1,2) Tiere		30	45888,70	1529,62	: Rest	5,499	P<< 1 %
4	Lage	1	63,78	63,78	: 34(1,2)	0,320	n.s.
12		8	53004,70	6625,58	: 3 (1,2)	4,331	P<< 1 %
14		1	341,33	341,33	: 34(1,2)	1,717	n.s.
24		8	973,08	121,63	: 34(1,2)	0,612	n.s.
34(1,2)		3	596,17	198,72	: Rest	0,714	n.s.
124		8	2174,12	271,76	: 34(1,2)	0,367	n.s.
Rest		363	100959,78	278,12			
Total		431	312780,87				

Tab.: 3 Varianzanalyse - Epithelhöhen - Östrogen und Östrogen + Progesteron

	Einfluß- größen	FG	SAQ	MAQ	F-Test	F-Wert	Signifikanz
1	Gruppen	2	16230,86	8115,43	: 3 (1,2)	177,728	$P \ll 1 \%$
2	Tiere	3	1385,04	461,68	: 3 (1,2)	10,110	$P \ll 1 \%$
3 (1,2)	Lage	6	273,97	45,66	: Rest	0,419	n.s.
4	Messungen	2	90,86	45,43	: 34(1,2)	0,367	n.s.
12		6	2092,58	348,76	: 3 (1,2)	7,637	$P < 5 \%$
14		4	946,72	236,68	: 34(1,2)	1,912	n.s.
24		6	942,58	157,09	: 34(1,2)	1,269	n.s.
34(1,2)		2	247,52	123,76	: Rest	1,136	n.s.
124		12	1120,16	93,34	: 34(1,2)	0,754	n.s.
Rest		28	3049,00	108,89			
Total		71	26379,31				

Tab.: 4 Varianzanalyse - Epithelhöhen - Physiologischer Ablauf

Fluoreszenzphotometrische Ergebnisse

Jede Säule stellt ein Präparat dar, bei dem 20 Kerne gemessen wurden. Zwei nebeneinanderstehende Säulen sind die Präparate eines Tieres.

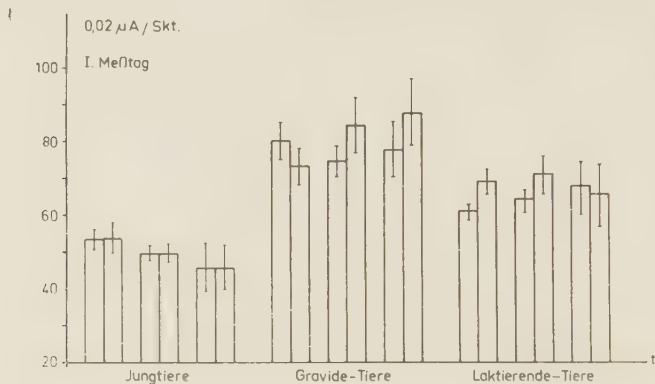


Abb.: 9 Physiologischer Ablauf

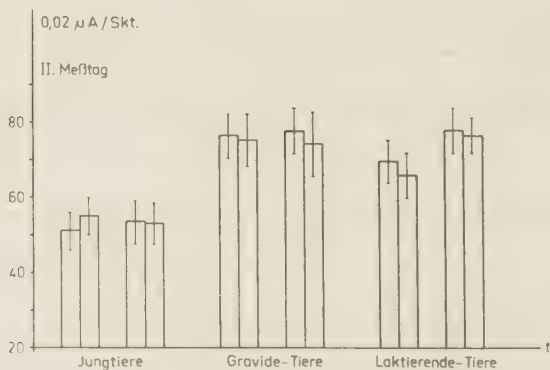


Abb.: 10 Physiologischer Ablauf

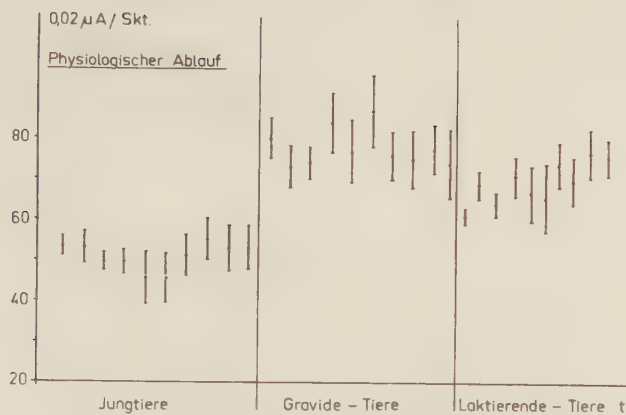
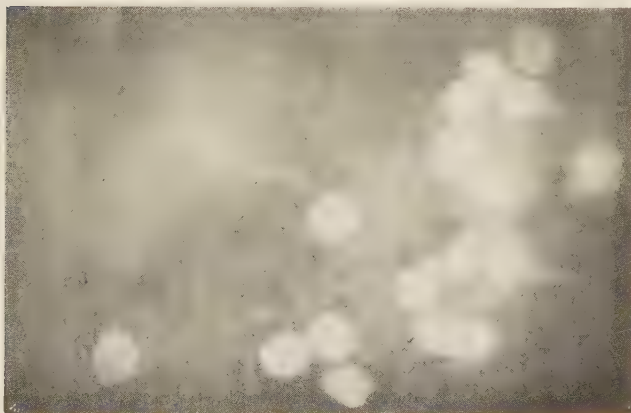


Abb.: 11 Physiologischer Ablauf, zusammenfassendes Ergebnis des 1. und 2. Meßtages.



Fluoreszenzphotometrische Aufnahme von Kernen des Milchdrüsenepithels.

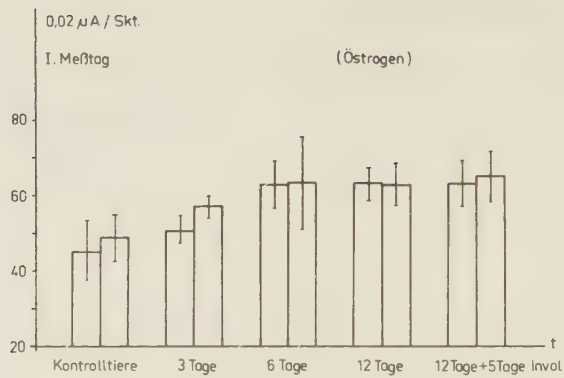


Abb.: 12 Hormoninjektion - Östrogen -

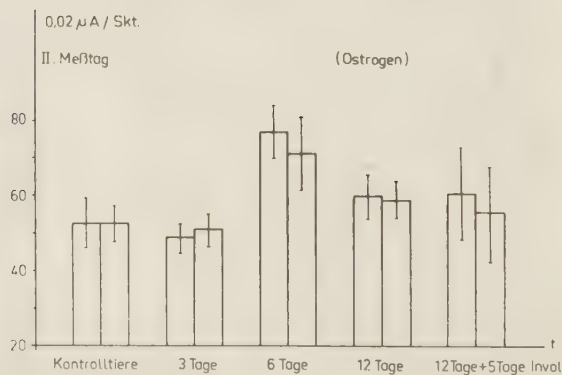


Abb.: 13 Hormoninjektion - Östrogen -

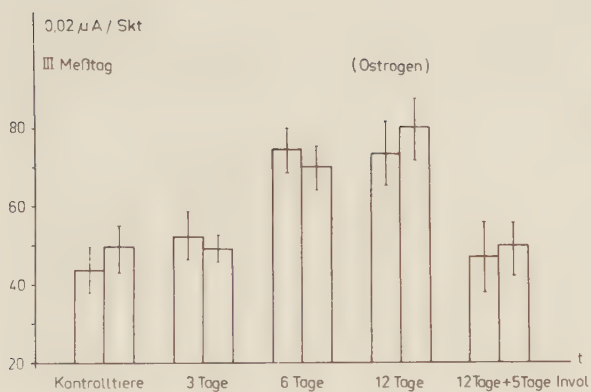


Abb.: 14 Hormoninjektion - Östrogen -

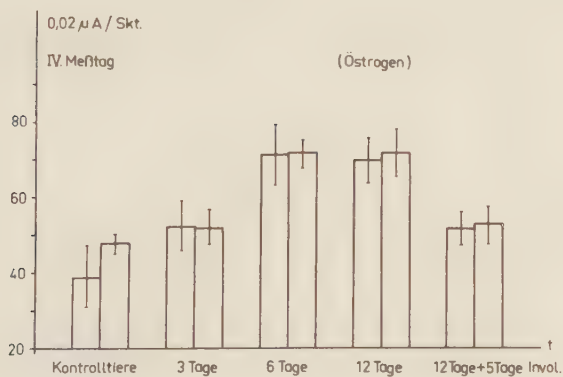


Abb.: 15 Hormoninjektion -- Östrogen -

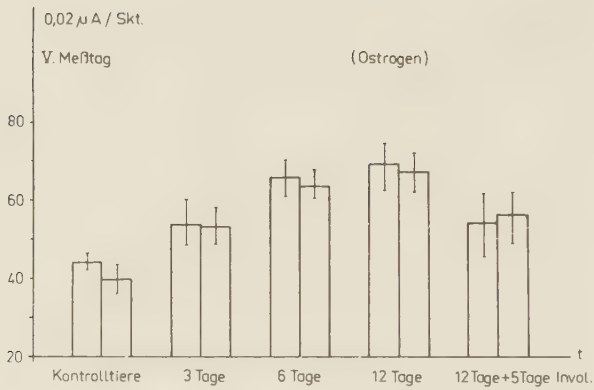


Abb.: 16 Hormoninjektion - Östrogen -

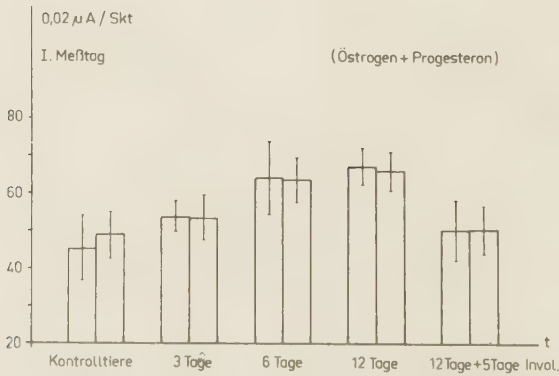


Abb.: 17 Hormoninjektion - Östrogen + Progesteron -

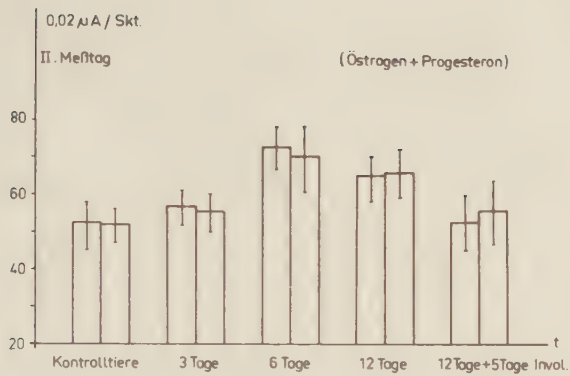
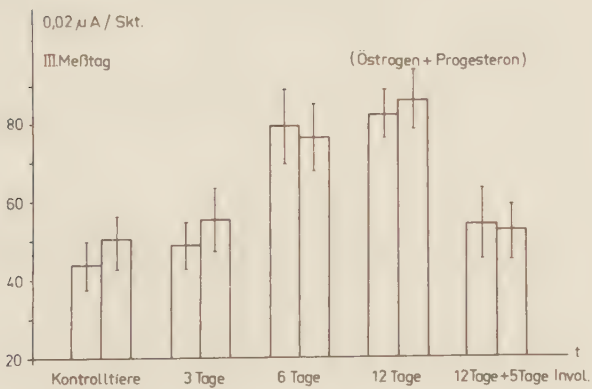


Abb.: 18 Hormoninjektion - Östrogen + Progesteron -



1

Abb.: 19 Hormoninjektion - Östrogen + Progesteron -

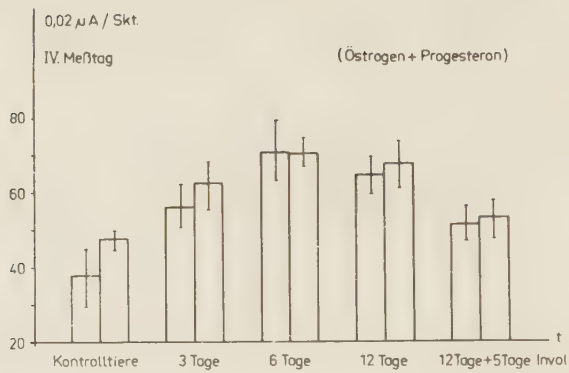


Abb.: 20 Hormoninjektion - Östrogen + Progesteron -

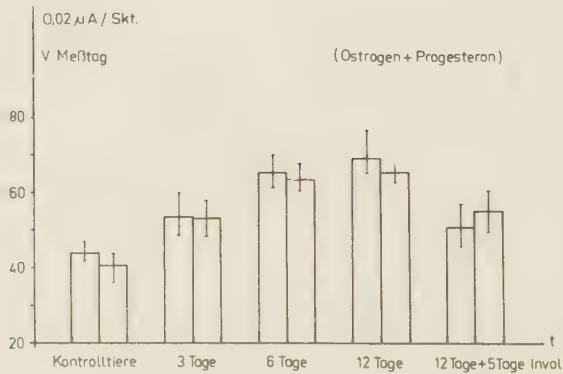


Abb.: 21 Hormoninjektion - Östrogen + Progesteron -

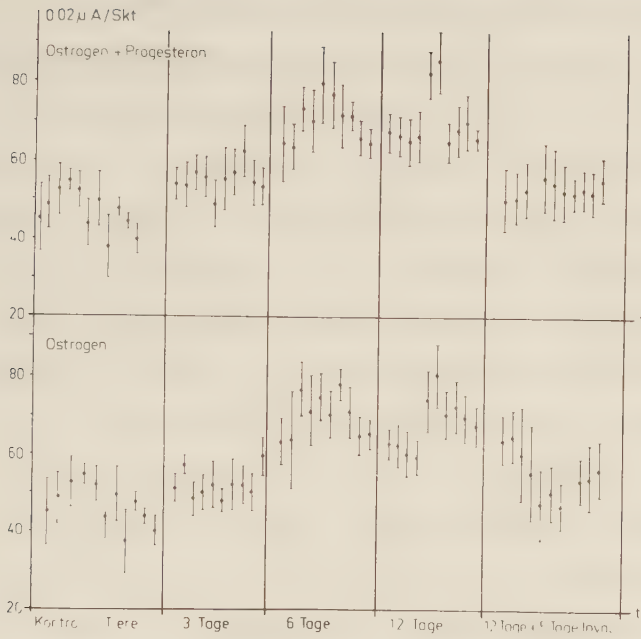


Abb.: 22 Zusammenfassung der Ergebnisse der
Hormoninjektion mit Östrogen und
Östrogen + Progesteron.

2. Fluoreszenzphotometrische Untersuchungen

Bei der Betrachtung der Emissionswerte von Akridinorange, angelagert an "freie" DNS-PO_4^- -Gruppen (Abb. 9 - 22), kann innerhalb der verschiedenen Gruppen wie auch der einzelnen Zeitstadien eine gleichmässige Emissionshöhe während der Messungen verschiedener Tage festgestellt werden. Die Schwankungen innerhalb der entsprechenden Zeitstadien zwischen den einzelnen Meßtagen sind durch die standardisierten Färbemaßnahmen zurückgedrängt. Ebenso ergeben die Messungen der Färbelösungen von Akridinorange vor und nach der Färbung bei verschiedenen Meßtagen gleichbleibende Emissionswerte zwischen den Werten 10 - 12 Skalenteilen bei einer Empfindlichkeit von $0,02 \mu\text{A/Skt.}$

Abb. 11 zeigt in der Zusammenfassung der Meßergebnisse von zwei Tagen für den Physiologischen Ablauf einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzemission des angelagerten AO und damit einen Anstieg "freier" DNS-Phosphat-Gruppen. Während Jungtiere eine geringe Emission der Zellkerne aufweisen, besteht eine erhöhte bei graviden Tieren, wobei das Niveau bei den laktierenden geringfügig absinkt (Abb. 9, 10 und 11).

Die verschiedenen Meßtage bei einer Versuchsgruppe mit Östrogen zeigen in den zeitlich ansteigenden Stadien gleichartige Zunahme der "freien" DNS-PO_4^- -Gruppen, die in der

Involutionsphase abnehmen (Abb. 12 - 16). Eine dreitägige Injektion zeigt gegenüber der Kontrollgruppe nur einen geringen Anstieg, einen erhöhten Anstieg nach 6 Tagen zu einem Maximum bei 12 Tagen mit Schwankungsbreiten von $0,2 \mu A$. In gleicher Weise ergeben die fünf verschiedenen Meßtage bei einer Versuchsgruppe Östrogen-Progesteron gleichartige Änderungen der Emission innerhalb der einzelnen Zeitstadien (Abb. 17 - 21). Das Maximalniveau der "freien" Phosphatgruppen der DNS liegt ebenso in einer Versuchsphase von 6 und 12 Tagen.

Nach 12 Tagen Hormoneinspritzung mit 5 Tagen anschließender Involution ist die quantitative Emissionsausbeute gegenüber dem Maximalniveau etwa um ein Viertel abgesunken. In der zusammenfassenden graphischen Darstellung von Abb. 22 ist ein deutlicher Anstieg der Emissionswerte auf einen erreichbaren Maximalwert nach 6 Tagen Injektion sowohl mit reinem Östrogen wie auch mit Östrogen-Progesteron zu ersehen, der auch bei 12 Tagen konstant bleibt. Beim Absetzen der Injektionen erfolgt ein Abfall der Emission. Ein Hormonversuch von 3 Tagen zeigt nur geringgradigen Effekt gegenüber den Kontrolltieren.

Hormonbehandelte Tiere, gravide und laktierende, zeigen gleichhohe Fluoreszenzwerte des Farbstoffes Akridinorange (AO). Das Mittel der Emission des Involutionsstadiums

liegt in allen Versuchsgruppen höher als der Ausgangswert der Kontrolltiere.

Statistische Auswertung

(Fluoreszenzphotometrischer Teil)

Aus den Meßwerten (20 Zellkerne pro Präparat) wurden der Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung s für jedes Präparat der einzelnen Zeitstadien von 5 gemessenen Serien (Meßtage) bestimmt und als Säulendiagramm bzw. Punktdiagramm mit Standardabweichung graphisch dargestellt. Aus der Meßzahl ergibt sich die Zahl $n = 20$ (siehe statistische Auswertung der quantitativen Kernmessung).

Zur Prüfung auf Signifikanz der unterschiedlichen Meßwerte in den einzelnen Zeitstadien wurde eine Varianzanalyse durchgeführt und die Wechselwirkung mit den anderen Faktoren untersucht.

Damit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Weisen die Emissionswerte der beiden verschiedenen Behandlungsgruppen Unterschiede auf?

Die Beantwortung dieser Frage gibt über unterschiedliche Hormonwirkung Aufschluß.

2. Verhalten sich die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten, bezogen auf die Versuchsgruppen, different?

Ist eine solche Wechselwirkung nachweisbar, so muß man eine unterschiedliche Reaktion der Tiere in den Versuchs-

gruppen annehmen.

3. Unterscheidet sich das mittlere Niveau der Emissionswerte in den fünf Zeitstadien?

Es wird statistisch geprüft, ob die Anzahl der mit AO reagierenden DNS-PO_4^- -Gruppen in den Zeitstadien verschieden groß ist.

4. Es ist bekannt, daß äußere Versuchsbedingungen bei der Durchführung eine Rolle spielen, die nicht leicht konstant zu halten sind. Haben die Einzelmessungen einen Einfluß auf die Ergebnisse?

Eine Abhängigkeit der Messungen von äußeren Versuchsbedingungen könnte die Ergebnisse in verschiedenen Zeitstadien und bei verschiedenen Behandlungen beeinflussen.

Bei der Hormonbehandlung wurde ein 4-faktorielles Modell (Versuchsgruppen, Tiere, Zeitstadien, Messungen) benutzt. Im Physiologischen Ablauf wurde der Faktor "Zeitstadien" nicht unterschieden, da in den Gruppen (Jungtiere, gravide, laktierende Tiere) die Unterteilung lag und somit ein 3-faktorielles System genügte.

Ergebnisse der Varianzanalyse (Tab. 5 und 6)

1. Zwischen den Versuchsgruppen mit Östrogen oder Östrogen-Progesteron kombiniert gibt es keine signifikanten Unterschiede.

	Einfluß- größen	FG	SAQ	MAQ	F-Test	F-Wert	Signifikanz
1	Gruppen	1	211,90	211,90	: 2 (1)	1	n.s.
2 (1)	Tiere	8	7181,27	8 97,65	--	--	--
3	Zeitstadien	4	182131,35	45532,83	: 23 (1)	36,20	P << 1 %
4	Messungen	39	1798,21	46,10	: 24 (1)	1	n.s.
13		4	1827,68	456,92	: 23 (1)	1	n.s.
14		39	656,95	16,84	: 24 (1)	1	n.s.
23 (1)		32	40 240,13	1257,50	--	--	--
24 (1)		312	15 454,72	49,53	--	--	--
34		156	9 664,60	61,95	: Rest	1,21	n.s.
134		156	5 181,95	33,21	: Rest	1	n.s.
234	= Rest	1248	63 387,40	50,79	--	--	--
Total		1999	327 736,27				

Tab.: 5 Varianzanalyse - Cytophotometrischer Teil - Östrogen und Progesteron

	Einfluß- größen	FG	SAQ	MAQ	F-Test	F-Wert	Signifikanz
1	Gruppen	2	75 756,22	37 878,11	: 2 (1)	67,89	$P \ll 1 \%$
2 (1)	Tiere	12	6 694,74	557,89	--	--	--
3	Messungen	39	2 276,20	58,36	: Rest	1,45	n.s.
13		78	2 346,44	30,08	: Rest	1	n.s.
23	= Rest	468	18 759,25	40,08	--	--	--
Total		599	105 832,87				

Tab.: 6 Varianzanalyse - Cytophotometrischer Teil

Jungtiere - Gravide - Laktierende

FG = Anzahl der Freiheitsgrade
 SAQ = Summe der Abweichungsquadrate
 MAQ = Mittleres Abweichungsquadrat
 $P \ll 0,01$ = Statistisch signifikant

2. Bei der Betrachtung der Gruppen (Jungtiere, Gravide, Laktierende) im physiologischen Ablauf zeigt sich eine hohe Signifikanz ($P \ll 0,01$). Die vorhandene Zahl der "freien" DNS-PO_4^- -Gruppen ist verschieden groß.
3. Signifikant ($P \ll 0,01$) sind ebenso die verschiedenen Messungen der Zeitstadien, die den statistischen Nachweis verschieden hoher Anzahl akridionorange-bindungsfähiger "freier" PO_4^- -Gruppen der DNS erbringt.
4. Zufällige Einflüsse auf die Emissionshöhe durch die Messungen der Einzelkerne wurden mit dem Ergebnis der Varianzanalyse ausgeschlossen.
5. Statistisch ergibt sich kein Anhalt für eine unterschiedliche Reaktion der Tiere.

DISKUSSION

1. Zur Biochemie des Kernstoffwechsels als methodische Voraussetzung:

Das DNS-Molekül stellt eine Doppelspirale dar, in der zwei DNS-Fäden antiparallel verlaufend miteinander verbunden sind, wobei das "Rückgrat" von Zucker-Phosphat-Ketten mit sich gegenüberstehenden Basenpaaren in der Seitenkette dargestellt wird (CRICK, 1961; WATSON, 1968). Die Anlagerung des kationischen AO geschieht wahrscheinlich an jedem dritten Basenpaar durch seine Dimethylamino-gruppen in Kontakt mit den PO_4^- -Gruppen sich gegenüberliegender DNS-Stränge. Hinzu kommt noch der Kontakt zu den oberhalb und unterhalb liegenden Basenpaaren, so daß sich ein stabiler Komplex bildet (BORISOVA u. TUMERMANN, 1965). Dabei ist das AO-Kation so eingelagert, daß die Ebene des Farbstoffmoleküls senkrecht zum Verlauf des DNS-Stranges steht (LERMAN, 1961, 1963; KASTEN, 1967). Elektrostatische heteropolare Valenzbindungen unter Bildung eines salzartigen Komplexes zwischen den freien DNS- PO_4^- -Gruppen und dem AO-Farbstoff sind für das Fluoreszenzverhalten der Zellkerne verantwortlich (SCHÜMMELFEDER, 1948; SCHÜMMELFEDER u. Mitarb., 1958).

Dabei wird den angelagerten AO-Molekülen durch die UV-Bestrahlung Energie zugeführt, und die Elektronen können, entgegen der Anziehung durch den Kern, in eine energiereichere äußere Schale angehoben werden. In diesem Zustand bleiben die Elektronen nur kurz und fallen danach in eine energieärmere Schale zurück. Die abgegebene Energie wird in Form von Licht frei, wobei naturgemäß das ausgestrahlte Licht eine kleinere Frequenz (größere Wellenlänge) als die erregende Strahlung hat (ZANKER, 1952 a, b; HOLLEMANN u. WIBERG, 1960).

Monomeres kationisches AO, wie es bei der Bindung an DNS-Phosphat-Gruppen vorliegt, führt zu keiner gegenseitigen sterischen Behinderung oder Aggregation. Die Fehlerquelle einer dimeren oder höheren Molekularanordnung des AO-Farbstoffes bei seiner Bindung an die DNS-PO_4^- - Gruppen konnte durch Untersuchungen von ZANKER (1952, a,b), ZANKER u. Mitarb. (1959), BRADLEY (1961), sowie STONE u. BRADLEY (1961) widerlegt werden.

Um eine Bindung des AO-Kations an anionische Gruppen der Histone, ribosomalen Proteine, Phosphatiden, Polysulfaten, Glykoproteinen, Polysacchariden und anorganischen Substanzen außer den sterisch "freien" DNS- und RNS- PO_4^- - Gruppen zu verhindern, wurde die Dissoziation durch einen

sauren pH 4,1 zurückgedrängt.

Kationische Gruppen (z.B. NH_4 -Gruppen der Nukleoproteine), die kompetitiv wirksam werden könnten, wurden durch Acetylierung und Behandlung mit Pyridin blockiert (DEITCH, 1964; RIGLER, 1966; KIEFER u. Mitarb., 1968).

Durch die verschiedene sterische Anlagerung des AO-Kations läßt sich bei Fluoreszenz im UV-Licht ein Maximum der Anregung bei einer Wellenlänge λ 530 nm (grün) für DNS-Phosphat-Gruppen von einem Fluoreszenzmaximum der RNS-Phosphat-Gruppen bei λ 665 nm (rot) unterscheiden (ZANKER, 1952; RIGLER, 1966). Somit ergab die Messung der Emissionsstärke bei 530 nm einen spezifischen Hinweis der Phosphatgruppen an der DNS.

Variante Untersuchungen von RIGLER (1966) führten zu folgenden Ergebnissen:

Die Diffusion des AO-Kations zum intrazellulären DNP (Desoxyriboprotein) wird nicht durch eine geänderte Permeabilität der Zellmembran beeinflusst, und somit können keine Unterschiede in der Farbstoffbindungskapazität auftreten.

Weder eine Erhöhung der AO-Konzentration der Färbelösung noch eine erhöhte Färbungs- oder Rediffusionszeit konnten die relative Differenz zwischen aufgenommenem Farbstoff bei stimulierter und nicht aktiver DNP verändern.

Färben mit Auslassen des Acetylierungsvorganges oder in einem neutralen pH führten zu gleichen Feststellungen. Ebenfalls konnte eine Erhöhung der AO-Bindungskapazität durch die Proteinkomponente ausgeschlossen werden. Diese Zweifel an der Aussagefähigkeit der AO-Bindungskapazität an DNS-Phosphat-Gruppen konnten dadurch zurückgedrängt werden (ZANKER, 1952; BEERS u. Mitarb., 1958; LERMAN, 1961 u. 1963; NEVILLE u. DAVIES, 1966; ICHIMURA u. Mitarb., 1969; SUGAR, 1970).

Erhöhte genetische Aktivität, wie sie aus der Fähigkeit zur Produktion von ribosomaler RNS gefolgert wird, ist mit einer feststellbaren Freisetzung von farbbindenden DNS-Phosphat-Gruppen aus dem Nukleinsäure-Protein-Komplex verbunden. An menschlichen Zellkulturen fanden ROSENBERG und CAVALIERI (1964) eine Auflockerung der Kernstruktur, bevor die RNS-Synthese abläuft. Durch diese Änderung der Helixstruktur wird auch die Trennung der beiden Stränge bei der DNS-Replikation erleichtert (TAYLOR, 1963; CAVALIERI u. ROSENBERG, 1963). Die Zunahme der Anlagerungsfähigkeit von kationischem AO ist wahrscheinlich in der Freisetzung sonst sterisch behinderter DNS-Phosphat-Gruppen zu sehen. Gerichtete Versuche zum Nachweis der sterischen Behinderung ergaben, daß bei Weg-

nahme von Histonen aus dem DNP-Komplex eine erhöhte RNS-Synthese festzustellen war (ALLFREY u. MIRSKY, 1962; HUANG u. BONNER, 1962; ALLFREY u.a., 1963; BONNER u. HUANG, 1964; BILLEN u. HNILICA, 1964). Elektronenmikroskopische Untersuchungen von FRENSTER u. Mitarb. (1963) zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Strukturwandel des Kernes und vermehrter Ausbildung eines Histon-DNS-Komplexes. Erst an histon-freien Zellkernen konnten KRAUS u. SANDRITTER (1968) die DNS durch cytophotometrische und interferenzmikroskopische Untersuchungen quantitativ erfassen.

Da nach Untersuchungen von HUANG u. BONNER (1962), FRENSTER u. Mitarb. (1963) und HUANG (1969) die "freien" PO_4^- - Gruppen als Haftpunkte für die Repräsentation der basischen Kernproteine, der Histone, angesehen werden, kann durch ihre erhöhten Nachweis auf die genetische Aktivität, die sich in einer vermehrten Proteinsynthese nach außen hin zeigt, geschlossen werden. Mit einer erhöhten Freisetzung von DNS-Phosphat-Gruppen erhält die Nukleinsäure-Helix einen höheren Ordnungsgrad, der sich in einer vermehrten Aufnahme des Akridinorange zeigt. Die höhere Ordnung, die zu einer Streckung des DNS-Moleküls führt, dürfte in einer erhöhten gegenseitigen Abstoßung der ungeschützt gleichgeladenen Phosphat-

gruppen der DNS zu finden sein, verbunden mit einer erhöhten Schwächung der Wasserstoffbrücken, wie auch in der abnehmenden Stabilität der DNS-Helix (ZUBAY u. DOTY, 1959; GIANONNI u. Mitarb., 1963). Die genetische Inaktivierung führt zu einer Neutralisation der farbstoffbindenden Phosphatgruppen der DNP, was zu einer Kontraktion der DNS-Moleküle mit einer gleichzeitigen Abnahme der helikalen Ordnung führt (HAYASHI u. Mitarb., 1963; WOOD u. BERG, 1964; MONESI, 1964 und 1965). Diese Feststellungen, die dem von JACOB u. MONOD (1961) offerierten Operator-Modell entgegenkommen, werfen einen weiteren Gesichtspunkt auf das Phänomen der "funktionellen DNS-Vermehrung" und der nicht mit einer mitotischen Teilung einhergehenden DNS-Synthese. Nach NOESKE (1969) muß der Begriff der "funktionellen DNS-Vermehrung" als irrtümliche Deutung aufgegeben und die Gültigkeit der DNS-Konstanz in einem neuen Licht gesehen werden (VENDRELY u. VENDRELY, 1948; DAVIDSON u. SMELLIE, 1952; NAORA, 1957). Die oftmals auf der Interpretation cytophotometrischer Ergebnisse der FEULGEN-Reaktion basierende Deutung einer "funktionellen DNS-Vermehrung" muß mit erheblichen Einschränkungen ihrer Anwendbarkeit betrachtet werden (SIBATANI, 1950; AT-KIN u. RICHARDS, 1956; THIERY, 1960;

GLEDHILL u. Mitarb., 1966; FAUTREZ, 1966; NOESKE, 1969).

2. Ergebnisse eigener Untersuchungen und deren

Deutung:

Die vorliegenden Studien zeigen bei vergleichender Betrachtung der Werte von Kontroll-Tieren, Jungtieren und Tieren mit 3-tägiger Hormonbehandlung nur eine geringe Emission von fluorchromierten "freien" Phosphat-Gruppen. Dies ist Ausdruck einer geringen synthetischen Aktivität der Kerne. Nur eine geringe Zahl der Phosphatgruppen ist von der Repressor-Substanz befreit und zur Bindung von kationischen AO fähig. Der geringe Grad der Aufknäuelung findet auch in der quantitativ erfaßbaren Kernvolumenvergrößerung seinen Ausdruck.

Das bestätigen auch die Ergebnisse der mehrtägigen Hormoninjektionen und der physiologische Ablauf von Gravidität und Laktation. Die durch Hormoneinwirkung stimulierte Milchdrüse befindet sich in einer erhöhten Bereitstellungsphase oder Aktivphase genetischer Information. Maximale Emissionsergebnisse des Akridinorange, gebunden an die "freien" DNS-PO_4^- -Gruppen, gehen mit einer erkennbaren Kernvergrößerung einher.

Die cytophotometrisch untersuchte Involutionsphase zeigt einen geringgradigen Abfall der Emissionswerte. Damit zusammenhängend ergibt sich auch in der Kerngrößenbestimmung eine mäßige, wenn überhaupt vorhandene Abnahme. Zwischen den Versuchsgruppen mit Östrogen bzw. Östrogen-Progesteron konnte in der hier angewandten Form kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die geringen Volumenänderungen der Kerne haben einen anderen Aussagewert. BÄSSLER u. FORSSMANN (1964) kamen durch elektronenmikroskopische Untersuchungen zu dem Schluß, daß Hormone zuerst an den Nukleinsäuren angreifen und durch eine Zustandsänderung des Chromatins eine Auflockerung verursachen. Der Nachweis einer Kernvergrößerung durch funktionelle Belastung (GRUNDMANN, 1964), die autoradiographischen Untersuchungen der Volumenvergrößerung von Kernen mit Steigerung des Kerneiweißgehaltes (ALTMANN u. GRUNDMANN, 1955) sowie die phasenkontrast-mikroskopischen Feststellungen einer Auflockerung der Chromosomen (POLLISTER, 1952) machen den Zusammenhang mit einer Veränderung der Tertiärstruktur der DNS deutlich. Nach den aufgeführten Gesichtspunkten hat auch SANDRITTER (1970) hinsichtlich der Repressorfunktion der Histone die Vorstellung, daß durch einen Induktor (z.B. exogenes Hormon) der genetische Informa-

tionsfluß dereprimiert werden kann, so daß die DNS für die Transkription in die m-RNS (Boten-RNS) und die Translation als Ausdruck der Umsetzung genetischer Information in eine Aminosäuresequenz abgerufen werden kann. So ist nicht die Vergrößerung des Zellkernes die primäre Antwort auf die Hormoninjektionen, sondern wird zwangsläufig durch die teilweise Trennung des Histon-DNS-Komplexes zur Syntheseaktivität ausgelöst. Sie findet ihr meßbares Substrat in der Emissionshöhe von AO-angefärbten "freien" DNS-Phosphat-Gruppen.

Es muß in diesem Zusammenhang offen bleiben, in wieweit mammogen wirkende hypophysäre Hormone, deren wichtigster Vertreter das Prolaktin ist, bei der Stimulation des Zellkernes einen Einfluß ausüben (FOLLEY, 1947 a,b und 1952; LYONS u.a., 1952, FLUX, 1958; LYONS, 1958). Somatotropin (STH) und Glucocorticoide wurden ebenfalls als notwendige Faktoren bei der Ausbildung einer funktionsfähigen Milchdrüse erkannt (LYONS u.a., 1952, 1953). Durch die angewandte cytophotometrische Methode konnte keine Aussage getroffen werden, weshalb im Stadium der Gravidität, wie auch der Laktation, bei vorhandener Erhöhung der "freien" DNS-PO_4^- -Gruppen es zu zwei verschiedenen Erscheinungsformen kommt:

1. In der Laktationsphase kommt es zur Sekretion und dabei zu einem erhöhten Proteinbedarf, der eine aktive Synthesetätigkeit voraussetzt.
2. Die Graviddtät findet ihren Ausdruck in einer ausreichenden Bereitstellung sekretionsfähigen Epithels.

In diesem Zusammenhang kann nur vermutet werden, daß, nach einer erreichten maximalen Bereitstellung genetischer Informationen in der Graviddtät, Faktoren vorhanden sind, die den Synthesemechanismus zur Soforthandlung, das heißt zur Sekretion post partum, ermöglichen.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist eine metrische Erfassung des Form- und Funktionswechsels des Zellkernes der Rattenmilchdrüse unter physiologischen Bedingungen und unter dem experimentellen Einfluß von Geschlechtshormonen.

In Ergänzung zu biochemischen Studien zu dieser Frage sollen der Formwechsel der Zellkerne karyometrisch und die hormonell induzierten Funktionsphasen cytophotometrisch analysiert und statistisch erhärtet werden.

Die Untersuchungen werden an insgesamt 149 Albino-Ratten eines Sprague-Dawley-Stammes einer Mainzer Tierzuchtanstalt durchgeführt.

1. Untersuchungsgruppe:

Juvenile, gravide und laktierende Tiere weisen bei der karyometrischen Messung verschiedene Kerngrößen des Alveolarepithels der Milchdrüse nach ihrem Funktionszustand auf. In den Stadien der Gravidität und Laktation sind die Epithelien erhöht, die Kerne der Epithelzellen vergrößert. Hiermit stimmen die cytophotometrisch erhaltenen Werte einer sprunghaft erhöhten Fluoreszenzemission der "freien" DNS-Phosphat-Gruppen, die durch das Fluorochrom Akridinorange angefärbt waren, überein.

2. Untersuchungsgruppe:

Unter dem Einfluß von Östrogen sowie Östrogen-Progesteron kombiniert kam es in der Proliferationsphase zu einem kontinuierlichen Anstieg der Epithelhöhe und der Kerngröße bei der metrischen Erfassung.

Mindestens 6 Tage nach Injektion von Östrogen und Progesteron zeigten die Tiere einen sprunghaften, etwa niveau-gleichen Anstieg der "freien" DNS-Phosphat-Gruppen, der eine spezifische Zustandsänderung in den Kernen erfaßt. Die Involutionsphase ergab eine Abnahme des Epithels und der Kerngröße, sowie der fluochromierten DNS-Phosphat-Gruppen.

Zwischen den Versuchsgruppen mit Östrogen und Östrogen-Progesteron konnten weder karyometrisch noch cytophotometrisch Unterschiede festgestellt werden.

Die Ergebnisse der statistischen Analyse der erhobenen Daten sprechen für einen direkten Einfluß der Hormonversuche auf die Freisetzung von DNS-Phosphat-Gruppen.

Durch den Nachweis vermehrter "freier" DNS-Phosphat-Gruppen mit einer erhöhten Syntheseaktivität konnte ein Freiwerden genetischer Information unter Hormoneinfluß gezeigt werden. Die Änderung der helikalen Struktur der DNS mit vermehrter Bindungskapazität von Akridinorange findet ihren meßbaren Ausdruck in einer Kernvolumenzunahme.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALFERT, M. u. N.O.GOLDSTEIN:
Cytochemical properties of nucleoprotein in
Tetrahymena pyriformis; a difference in
protein composition between macro- and
micronuclei.
J. Exper. Zool. 130, 403 - 419 (1955).
2. ALLFREY, V.G. u. A.E.MIRSKY:
Evidence for the complete DNA-dependence
of RNA synthesis in isolated thymus nuclei.
Proc. nat. Acad. Sci.(Wash.) 48,
1590 - 1596 (1962).
3. ALLFREY, V.G., V.C.LITTAU u. A.E.MIRSKY:
On the role of histones in regulating ribo-
nucleic acid synthesis in the cell nucleus.
Proc. nat. Acad. Sci.(Wash.) 49,
414 - 421 (1963).
4. ALTMANN, H.-W. u. E.GRUNDMANN:
Phasenkontrastmikroskopische Unter-
suchungen zur Vitalstruktur tierischer
Zellkerne.
Beitr. path. Anat. 115, 313 - 347 (1955).
5. ASTWOOD, E.B., C.F.GESCHICKTER u. E.O.RAUSCH:
Development of the mammary gland of the
rat.
Amer. J. Anat. 61, 373 - 405 (1937).
6. ATKIN, N.B. u. D.M.RICHARDS:
Deoxyribonucleic acid in human tumours as
measured by microspectrophotometry of
Feulgen stain:
A comparison of tumours arising at different
sites.
Brit.J.Cancer 10, 769 - 786 (1956).
7. BÄSSLER, R. u. W.FORSSMANN:
Experimenteller Strukturwandel der Drü-
senzelle durch Hormonwirkung.
Verh. dtsch.Ges.Path. 48, 240-245 (1964).

8. BEERS Jr., R.F., D.D. HENDLEY u. R.F. STEINER:
Inhibition and activation of polynucleotide
phosphorylase through the formation of
complexes between acridine orange and
polynucleotides.
Nature (Lond.) 182, 242 - 244 (1958).
9. BENNINGHOFF, A.:
Funktionelle Kernschwellung und Kern-
schrumpfung.
Anat. Nachr. 1, 50 - 52 (1950).
10. BENNINGHOFF, A.:
Vermehrung und Vergrößerung von Ner-
venzellen bei Hypertrophie des Innerva-
tionsgebietes.
Z. Naturforsch. 6 b, 38 - 41 (1951).
11. BENSON, G.K., A.T. COWIE u. a.:
Effects of oestrone and progesterone
on mammary development in the guinea-
pig.
J. Endocr. 15, 126 - 144 (1957).
12. BERTYLANFFY, L.v. u. I. BICKIS:
Identification of cytoplasmic basophilia
(ribonucleic acid) by fluorescence micros-
copy.
J. Histochem. Cytochem. 4, 481-493 (1956).
13. BERTALANFFY, L.v.:
Acridineorange fluorescence in cellphysio-
logy, cytochemistry and medicine.
Protoplasma (Wien) 57, 51 - 83 (1963).
14. BEYER, H.:
Lehrbuch der organischen Chemie,
Leipzig 1963.
15. BILLEN, D. u. L.S. HNILICA:
Inhibition of DNA synthesis by histones.
In: The nucleohistones,
hrsg. v. J. Bonner u. P. Ts'o.
San Francisco 1964, S. 289 - 297.

16. BLACK, M.M. u. H.R. ANSLEY:
Antigen induced changes in lymphoid cell histones.
I. Thymus. II. Regional lymph nodes.
J. Cell Biol. 26, 201 - 208; 797 - 803 (1965).
17. BÖHM, N. u. E. SPRENGER:
Fluorescence Cytophotometry:
A valuable method for the quantitative determination of nuclear Feulgen-DNA.
Histochem. 16, 100 - 118 (1968).
18. BONNER, J. u. CH. C. HUANG:
Role of histones in chromosomal RNA synthesis. In: The nucleohistones, hrsg. v. J. Bonner u. P. Ts'o.
San Francisco 1964, S. 251 - 261.
19. BONNER, J.:
Molecular biology of development,
Oxford 1965.
20. BORISOVA, O.F. u. L.A. TUMERMAN:
Application of Acridine orange luminescence to the study of secondary structure of nucleic acids.
Biofizika 10, 32 - 36 (1965).
21. BRADLEY, D.F.:
Molecular biophysics of dye polymer complexes.
Trans. N.Y. Acad. Sci. 24, 64 - 74 (1961).
22. BUCHER, O.
Die Amitose der tierischen und menschlichen Zelle. In: Protoplasmatologia 6, Ergbd 1, hrsg. v. H. Bauer.
Wien, 1959.
23. BUKATSCH, F. u. M. HAITINGER:
Beiträge zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Zellinhaltes insbesondere des Cytoplasmas und des Zellkernes.
Protoplasma (Wien) 34, 515 - 523 (1940).
24. CASPERSSON, T., H. J. HOLMGREN:
Variationen der Kerngröße während der verschiedenen Phasen der Leberarbeit.
Anat. Anz. 79, 53 - 59 (1934).

25. CASPERSSON, T.:
Über den chemischen Aufbau der Strukturen
des Zellkernes.
Skand. Arch. Physiol. 73, Suppl. 8,
1 - 151 (1936).
26. CASPERSSON, T.:
Cell Growth and Cell Function,
New York 1950.
27. CAVALIERE, L.F. u. B.H. ROSENBERG:
Nucleic acids and Information Transfer.
In: Progress in Nucleic acid Research 2,
hrsg. v. J.N. Davidson u. E.W. Cohn.
New York 1963, S. 1 - 18.
28. COOPER, H.L. u. A.D. RUBIN:
RNA metabolism in lymphocytes stimulated
by phytohemagglutinin. Initial response to
phytohemagglutinin.
Blood 25, 1014 - 1027 (1965).
29. CRICK, F.H.C., L. BARNETT u.a.:
General nature of the genetic code for
proteins.
Nature (Lond.) 192, 1227 - 1232 (1961).
30. CURTISS, C.:
Factors influencing lobulo-alveolar develop-
ment and mammary secretion in the rat.
Endocrinology 45, 284 - 285 (1949).
31. DABLOW, A.:
Die Milchdrüse. In: Handbuch der mikrosko-
pischen Anatomie des Menschen 3, Ergbd 1,
hrsg. v. W.v. MOELLENDORFF u.
W. BARGMANN.
Berlin, Göttingen, Heidelberg 1957.
32. DAVIDSON, J.N. u. R.M.S. SMELLIE:
Phosphorus compounds in the cell.
II. The separation by ionophoresis on paper
of the constituent nucleotides of ribonucleic
acid.
III. The incorporation of radioactive phospho-
rus into the ribonucleotide fraction of liver
tissue.
Biochem. J. 52, 594 - 606 (1952)..

33. DEITCH, A.D.:
A method for the cytophotometric estimation of nucleic acids using methylene blue.
J. Histochem. Cytochem. 12, 451- 461 (1964).
34. DENKHAUS, W. u. D. HEIMER:
Mikrofluorometrische Bestimmung der "freien DNS- PO_4^- -Gruppen" im Chromatin nativer Leberzellkerne von jungen und alten Meerschweinchen.
Gerontologia (Basel) 16, 1 - 13 (1970).
35. DOLLAY, D.H.:
The general morphology of pancreatic cell function in terms of the nucleo-cytoplasmic relation.
Amer. J. Anat. 35, 153 - 197 (1925).
36. FAUTREZ, J.:
Variations de la teneur en acide désoxyribonucléique (AND) des noyaux interphasiques en fraction de l'activité cellulaire et leurs relations avec les variations du volume nucléaire. In: Handbuch der Histochemie 3,3, hrsg. v. W. GRAUMANN u. K. NEUMANN. Stuttgart 1966, S. 54 - 115.
37. FLUX, D.S. u. R.E. MUNFORD:
The effect of adrenocorticotropin on the mammary glands of intact mature female mice of the chi-strain.
J. Endocr. 14, 343 - 347 (1957).
38. FLUX, D.S.:
Mammary gland growth in male mice of the CH I strain after hypophysectomy and castration.
J. Endocr. 17, 300 - 306 (1958).
39. FOLLEY, S.J.:
Endocrine control of the mammary gland. I. Mammary development.
Brit. med. Bull. 5, 130 - 134 (1947 a).

40. FOLLEY, S.J.:
Recent researches on the physiology of
mammary development and function.
Proc.Roy.Soc. B 40, 903 - 906 (1947 b).
41. FOLLEY, S.J.:
Some effects of steroids on the mammary
gland. In: Ciba Foundation Colloquia on
Endocrinology 1,
hrsg. v. G.E.W.WOLSTENHOLME.
London 1952, S. 86.
42. FOLLEY, S.J.:
Hormones in mammary and function.
Brit.med.Bull. 11, 145 (1955).
43. FRENSTER, J.H., ALLFREY, V.G. u. A.E. MIRSKY:
Repressed and active chromatin isolates from
interphase lymphocytes.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 50,
1026 - 1032 (1963).
44. GERBAULET, K., J. BRÜCKNER u. W. MAURER:
Autoradiographische Untersuchungen über
den Einfluß einer Röntgen-Ganzkörper-
Bestrahlung auf die Eiweißsyntheserate im
Zellkern.
Naturwissenschaften 48, 526 - 527 (1961).
45. GIANNONI, G., A.R. PEACOCKE u. I.O. WALKER:
Thymus deoxyribonucleoprotein V. The ef-
fect of denaturation on sedimentation.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 72,
469 - 474 (1963).
46. GLEDHILL, B.L., M.P. GLEDHILL u. a.:
Changes in deoxyribonucleoprotein during
spermiogenesis in the bull.
Exp. Cell Res. 14, 652 - 665 (1966).
47. GRIFFITH, D.R. u. C.W. TURNER:
Normal growth of rat mammary glands
during pregnancy and early lactation.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 106,
448 - 450 (1961).

48. GRUNDMANN, E.:
Beiträge zur Krebsentstehung in der Ratten-
leber, an Hand mikrophotometrischer DNS-
Messungen.
Verh. dtsh Ges. Path. 38, 362-370 (1955).
49. GRUNDMANN, E. u. G. BACH:
Amitosen, Endomitosen und Mitosen nach
partieller Hepatektomie.
Beitr. path. Anat. 123, 144 - 172 (1960).
50. GRUNDMANN, E.:
Allgemeine Cytologie. Eine Einführung in die
funktionelle Morphologie der Zelle.
Stuttgart 1964.
51. HAYASHI, M., M.N. HAYASHI u. S. SPIEGELMANN:
Restriction of in vivo genetic transcription
to one of the complementary strands of DNA.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 50,
664 - 672 (1963).
52. HEINE, H.:
Der Ultrapak.
Z. wiss. Mikr. 48, 450 - 465 (1931).
53. HERRMANN, R.L., A.R. O'MEARA u.a.:
Age-associated changes in the nucleoprotein
complex of mouse liver. In: 8th. Intern.
Congr. Geront. Proc. 1.
Washington 1969, S. 141 - 142.
54. HOLLEMAN, A.F. u. E. WIBERG:
Lehrbuch der anorganischen Chemie,
Berlin 1960.
55. HUANG, R.Ch.C.:
Decoding of genetic information in higher
systems.
8th. Intern. Congr. Geront. Proc. 1.
Washington 1969, S. 131 - 133.
56. HUANG, R.Ch.C. u. J. BONNER:
Histone, a suppressor of chromosomal RNA
synthesis.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 48,
1216 - 1222 (1962).

57. ICHIMURA, S., M. ZANCA u.a.:
The nature of strong binding between acridine orange and deoxyribonucleic acid as revealed by equilibrium dialysis and thermal denaturation.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 190, 116 - 125 (1969).
58. JAKOB, F. u. J. MONOD:
Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins.
J. molec. Biol. 3, 318 - 356 (1961).
59. JACOB, W.:
Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdopplung ihres Volumens.
Arch. Entw. mechan. 106, 124 (1925).
60. JACOB, W.:
Volumetrische Untersuchungen an den Zellkernen des Menschen.
Verh. anat. Ges. 40, 236 (1931).
61. KASTEN, F. H.:
Cytochemical studies with acridine orange and the influence of dye contaminants with staining of nucleic acids.
Int. Rev. Cytol. 21, 145 - 201 (1967).
62. KIEFER, G., R. KIEFER u. W. SANDRITTER:
Cytophotometric determination of the binding of basic dyes by DNA following acetylation.
Histochem. 14, 65 - 71 (1968).
63. KING, R. J., J. GORDON u. D. R. INMAN:
The intracellular localization of oestrogen in rat tissues.
J. Endocr. 32, 9 - 15 (1965).
64. KILLANDER, D. u. R. RIGLER Jr.:
Initial changes of deoxyribonucleoprotein and synthesis of nucleic acid in phytohemagglutinin stimulated human leucocytes in vitro.
Exp. Cell Res. 39, 701 - 704 (1965).

65. KIRKHAM, W.R. u. C.W. TURNER:
Introduction of mammary growth in rats
by estrogen and progesterone.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 87,
139 (1954).
66. KON, S.K. u. A.T. COWIE:
Milk. The mammary gland and its secretion 1,
New York, London 1961.
67. KRAUS, H. u. W. SANDRITTER:
Interferenzmikroskopische Untersuchungen
zur Analyse von Zellkernen.
I. Versuche zur Bestimmung von Globulin-
fraktion.
II. Versuche zur Bestimmung von DNS,
Histonen und des Deoxyribonukleoproteins.
Histochem. 15, 99 - 139 (1968).
68. KULENKAMPPFF, H. u. E. WÜSTENFELD:
Funktionsbedingte Veränderungen der Kern-
größe von Gliazellen im Grau des Rücken-
markes der weißen Maus.
Z. Anat. Entwickl.-Gesch. 118, 97 - 101
(1954).
69. LERMAN, L.S.:
Structural Consideration in the interaction
of DNA and Acridines.
J. molec. Biol. 3, 8 - 30 (1961).
70. LERMAN, L.S.:
The structure of the DNA-Acridine complex.
Biochemistry 49, 94 - 101 (1963).
71. LE ROY, H.:
Vereinfachte Regel zur Bestimmung des kor-
rekten F-Testes beim Faktorenversuch.
Landw. Forsch. (Schweiz) 3, 277-281 (1965) .
72. LEUCHTENBERGER, C.:
A cytochemical study of pyknotic nuclear
degenerations.
Chromosoma (Berl.) 3, 449 - 473 (1950).
73. LEUCHTENBERGER, C. u. F. SCHRADER:
The chemical nature of the acrosome in the

male germ cells.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 36,
677 - 683 (1950).

74. LEUCHTENBERGER, C., R. VENDRELY u.
C. VENDRELY:
A comparison of the content of desoxyribo-
senucleic acid (DNA) in isolated animal nu-
cleic by cytochemical and chemical methods.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 37, 33- 38
(1951).
75. LYONS, W. R., C. H. LI u. R. E. JOHNSON:
The enhancing effect of somatropin on the
mammary growth induced in rats with estrin,
progesterin and mammatropin.
J. clin. Endocr. 12, 937 (1952).
76. LYONS, W. R., C. H. LI u. a.:
Some of the hormones required by the mam-
mary gland in its development and function.
J. clin. Endocr. 13, 836 - 837 (1953).
77. LYONS, W. R.:
Hormonal synergism in mammary growth.
Proc. Roy. Soc. B 149, 303 - 325 (1958).
78. MAYERSBACH, H. u. F. SCHLAGER:
Leberzellkernreaktionen nach parenteraler
Eiweißzufuhr.
Anat. Anz. 108, 129 - 147 (1960).
79. MEITES, J.:
Mammary growth and lactation. In: Repro-
duction in domestic animals 1, hrsg. v.
H. H. COLE u. P. T. CUPPS,
New York, London 1959, S. 539.
80. MIRSKY, A. E. u. H. RIS:
The deoxyribonucleic acid content of animal
cells and its evolutionary significance.
J. gen. Physiol. 34, 451 - 462 (1951).
81. MONESI, V.:
Autoradiographic evidence of a nuclear
histone synthesis during mouse spermiogenesis

in the absence of detectable quantities of nuclear ribonucleic acid.

Exp. Cell Res. 36, 683 - 688 (1964).

82. MONESI, V.:

Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse RNA and Protein.

Exp. Cell Res. 39, 197 - 224 (1965).

83. MOSIMANN, W.:

Das Volumen der Zellkerne im Epithel der Milchdrüse in Abhängigkeit vom Funktionszustand und bei Stilboestrolzufuhr.

Z. mikr.-anat. Forsch. 63, 303-316 (1957).

84. MUNFORD, R.E.:

A Review of anatomical and biochemical changes in the mammary gland with particular reference to quantitative methods of assessing mammary development.

Dairy Sc. Abstr. 26, 293 - 304 (1964).

85. NAORA, H.:

Microspectrophotometry of cell nuclei stained with Feulgen reaction.

III. The DNA content of individual nuclei of rat tissues in the postnatal growth.

Exp. Cell Res. 12, 1 - 14 (1957).

86. NEVILLE, D.M. u. D.R.DAVIES:

The interaction of acridine dyes with DNA. An x-ray diffraction and optical investigation.

J. molec. Biol. 17, 57 - 61 (1966).

87. NOESKE, K.:

Diskrepanzen von Feulgen-Wert und DNS-Gehalt.

Histochem. 20, 322 - 327 (1969).

88. OEHLERT, W. u. B.SCHULTZE:

Die Kerngröße als Ausdruck der synthetischen Aktivität des Kerns. Autoradiographische Untersuchungen mit radioaktiv-markierten Aminosäuren zur Größe der Proteinsynthese im Kern verschiedener Zellarten der Ratte.

Beitr. path. Anat. 123, 101 - 113 (1960).

89. POLLISTER, A.W., M.HIMES, u. L.ORNSTEIN:
Localization of substances in cells.
Fed. Proc. 10, 629 - 639 (1952).
90. PUFF, A.:
Neue morphologische Befunde an der Netzhaut zur Bestätigung der Duplizitätstheorie.
Verh.anat. Ges.(Jena) 48, 124 - 125 (1951).
91. RATHER, L.J.:
The significance of nuclear size in physiological and pathological processes.
Ergebn. allg. Path. path. Anat. 38,
127 - 199 (1958).
92. RIGLER, R. Jr.:
Microfluorometric characterisation of intracellular nucleic acids and nucleoproteins by acridin orange.
Acta physiol.scand. 67, Suppl. 267, 1 - 123 (1966).
93. RIS, H.:
Ultrastructure of the animal chromosome.
In: Regulation of nucleic acid and protein biosyntheses, hrsg. v. V.V.Koningsberger u. L. Bosch.
Amsterdam, London, New York 1967, S.11 - 21.
94. ROMEIS, B.:
Mikroskopische Technik,
München, Wien 1968.
95. ROSENBERG, B.H. u. L.F.CAVALIERI:
On the transient template for in vivo DNA synthesis.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 51,
826 - 834 (1964).
96. SANDRITTER, W.:
Funktionsstrukturen des Zellkerns Eu- und Heterochromatin.
Stuttgart, New York 1970.

97. SCHAIRER, E.:
Kernmessungen und Chromosomenzählungen
an menschlichen Geschwülsten.
Z. Krebsforsch. 43, 1 (1936).
98. SCHÜMMELFEDER, N.:
Die Fluorochromierung tierischer Zellen mit
Akridinorange.
Naturwissenschaften 35, 346 (1948).
99. SCHÜMMELFEDER, N.:
Die Fluorochromierung des lebenden, über-
lebenden und toten Protoplasmas mit dem
basischen Farbstoff Akridin-Orange und ihre
Beziehung zur Stoffwechselaktivität der
Zelle.
Virchows Arch. path. Anat. 318, 119 - 154
(1950).
100. SCHÜMMELFEDER, N., K.J.EBSCHNER u.
R.E.KROGH:
Die Grundlage der differenten Fluorochro-
mierung von Ribo- und Desoxyribonucleinsäure
mit Akridinorange.
Naturwissenschaften 44, 467 - 468 (1957).
101. SCHÜMMELFEDER, N., R.E.KROGH u.
K.J.EBSCHNER:
Färbungsanalysen zur Akridinorange-Fluoro-
chromierung. Vergleichende histochemische
und fluoreszenz-mikroskopische Untersu-
chungen am Kleinhirn der Maus mit Akridin-
orange- und Gallocyanin-Chromalaun-Färbun-
gen.
Histochem. 1, 1 - 28 (1958).
102. SIBATANI, A.:
Effects of histone and other proteins on
the Feulgen-reaction.
Nature (Lond.) 166, 355 - 356 (1950).
103. STÖCKER, E.:
Autoradiographische Untersuchungen zur
Deutung der funktionellen Kernschwellung
am exokrinen Pankreas.
Z. Zellforsch. 57, 47 - 62 (1962 a).

104. STÖCKER, E.:
Autoradiographische Untersuchungen zur
Ribonucleinsäure- und Eiweiß-Synthese im
nuklearen Funktionsformwechsel der exokri-
nen Pankreaszelle.
Z.f.Zellforsch. 57, 145 - 171 (1962 b).
105. STONE, A.L. u. D.F. BRADLEY:
Aggregation of acridine orange bound to
polyanions: the stacking tendency of deoxy-
ribonucleic acids.
J.Amer. chem. Soc. 83, 3627 - 3634
(1961).
106. STRUGGER, S.:
Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen
über die Aufnahme und Speicherung des
Akridinorange in lebenden und toten Pflan-
zenzellen.
Z.f. Naturw. (Jena) 73, 97 - 134 (1940).
107. STRUGGER, S.:
Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie,
Hannover 1949.
108. SUGAR, J.:
Ultrastructure of cell stained with acridine
orange.
Virchows Arch. path. Anat. Abt. B 5,
209 - 218 (1970).
109. TAUCHI, H. u. T. SATO:
Some micromeasuring studies of hepatic
cells in senility.
J.Geront. 17, 254 - 259 (1962).
110. TAYLOR, J.H.:
The Replication and Organization of DNA
in Chromosomes. In: Molecular genetics 1,
hrsg. v. J.H. Taylor.
New York 1963, S. 65 - 111.
111. THIERY, M.:
Les variations de la teneur en acide désoxy-
ribonucléique (DNA) des noyaux de l'épithé-
lium vaginal de la souris au cours du cycle
oestral.
Arch. Biol (Liège) 71, 389 - 406 (1960).

112. TUCKER, H.A. u. R.P. REECE:
Nucleic acid content of mammary glands of pregnant rats.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 112,
370 - 372 (1963 a).
113. TUCKER, H.A. u. R.P. REECE:
Nucleic acid content of mammary glands of lactating rats.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 112,
409 - 412 (1963 b).
114. TUCKER, H.A. u. R.P. REECE:
Nucleic acid content of rat mammary glands during post-lactational involution.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 112,
1002 - 1004 (1963 c).
115. VENDRELY, R. u. C. VENDRELY:
La teneur du noyau cellulaire en acide dés-oxyribonucléique à travers les organes, les individus et les espèces animales.
Experientia (Basel) 4, 434 - 436 (1948).
116. WATSON, J. D.:
The Double Helix,
London 1968.
117. WOOD, W.B. u. P. BERG:
Influence of DNA secondary structure on DNA-dependent polypeptide synthesis.
J. molec. Biol. 9, 452 - 471 (1964).
118. ZANKER, V.:
Über den Nachweis definierter reversibler Assoziate ("reversibler Polymerisate") des Akridinorange durch Absorption und Fluoreszenzmessungen in wässriger Lösung.
Z. Phys. Chem. 199, 225 - 258 (1952 a).
119. ZANKER, V.:
Quantitative Absorptionsmessungen am Akridinorange-Kation.
Z. phys. Chem. 200, 250 - 292 (1952 b).

120. ZANKER, V., M. HELD u. H. RAMMENSEE:
Neuere Ergebnisse der Absorptions-, Fluoreszenz- und Fluoreszenz-Polarisationsgrad-Messungen an Akridinorange-Kation, ein weiterer Beitrag zum Metachromasie-Problem dieses Vitalfarbstoffes.
Z. Naturforsch. 14 b, 789 - 801 (1959).
121. ZUBAY, G. u. R. DOTY:
The isolation and properties of deoxyribonucleoprotein particles containing single nucleic acid molecules.
J. molec. Biol. 1, 1 - 20 (1959).

Herrn Professor Dr. H. Bredt möchte ich danken, daß ich an seinem Institut diese Arbeit anfertigen konnte.

Besonders gilt mein Dank Herrn Professor Dr. R.Bässler für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung.

Herrn Dr. W.Denkhaus danke ich für die Beratung und Hilfe in cytophotometrischen Fragen, wie auch Herrn Priv.Do. Dr. L.Horbach (Institut für Med. Statistik und Dokumentation, Direktor: Prof. Dr.Dr.S.Koller) für die Beratung und statistische Auswertung.

L e b e n s l a u f

Am 11. Dezember 1943 wurde ich, Uwe Klein, als einziges Kind des Kommunalbeamten Kurt Klein und seiner Ehefrau Anneliese, geb. Anhelm, in Magdeburg geboren. Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit. Meine Kindheit verbrachte ich in Neustadt/Weinstraße. Ostern 1950 trat ich in die Grundschule in Neustadt/Weinstraße ein, besuchte anschließend das Leibnitz-Gymnasium von Neustadt im Mathem.-Naturwissenschaftl. Zweig und legte am 24. Februar 1964 meine Reifeprüfung ab. Nach dem Abitur wurde ich am 2. April 1964 zu einem zweijährigen Wehrdienst in der Bundeswehr eingezogen, den ich als Leutnant der Reserve verließ.

Im Sommersemester 1966 begann ich an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz das Medizinstudium. Am Ende des Wintersemesters 1966/67 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am Ende des Sommersemesters 1968 die ärztliche Vorprüfung ab. Auch die klinischen Semester absolvierte ich in Mainz, wo ich am 10. Dezember 1971 das medizinische Staatsexamen abgelegt habe.

Anschrift: Uwe Klein

673 Neustadt/Weinstr., Gartenstr. 26

